

RAFAEL MAZER ETTO

**COMUNIDADES PROCARIÓTICAS DAS TURFEIRAS DOS CAMPOS DE
ALTITUDE PARANAENSES**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná como requerimento parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências-
Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Berenice R.
Steffens

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo M. Cruz

**CURITIBA
2011**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Etto, Rafael Mazer

Comunidades procarióticas das turfeiras dos campos de altitude
paranaense. / Rafael Mazer Etto. – Curitiba, 2011.
145 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria Berenice Reynaud Steffens

Co-orientador: Leonardo Magalhães Cruz

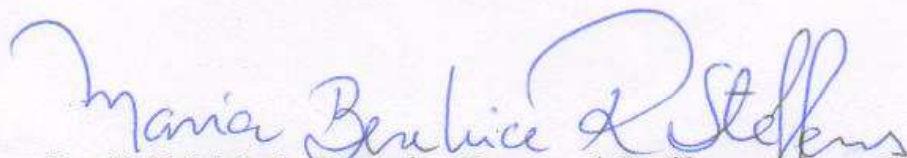
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Procariotes 2. Turfeira - Paraná I. Título II. Steffens, Maria Berenice
Reynaud III. Cruz, Leonardo Magalhães IV. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica.

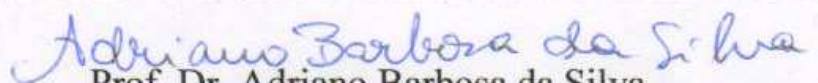
CDD (20. ed.) 589.9

RAFAEL MAZER ETTO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora formada pelos professores:



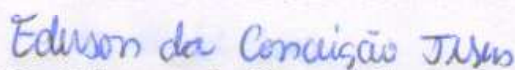
Prof.^a. Dr.^a Maria Berenice Reynaud Steffens- orientadora
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Adriano Barbosa da Silva
Programa de Pós-graduação em Bioinformática – UFPR



Prof.^a. Dr.^a. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet
Universidade Estadual de Goiás (GO)



Dr. Ederson da Conceição Jesus
EMBRAPA Agrobiologia (RJ)



Prof.^a Dr.^a Rose Adele Monteiro
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 12 de setembro de 2011

Aos meus pais, à minha esposa
e às minhas filhas

AGRADECIMENTO CIENTÍFICO

À professora Dr^a. Maria Berenice R. Steffens pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade que vem desde 2001 quando ingressei na Iniciação Científica. Obrigado por me abrir tantas “portas” e contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Leonardo Magalhães Cruz pela co-orientação, pelo auxílio nas análises de Bioinformática, pela amizade e confiança.

Aos professores Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e Dr^a Rose Adele Monteiro pela análise crítica da primeira versão dessa tese.

Aos professores Dr. Wanderson da Rocha e Dr^a Rose Adele Monteiro pela correção dos relatórios anuais.

Aos professores Dr. Fábio de Oliveria Pedrosa, Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Dr. Ricardo Antônio Ayub por disponibilizarem a infra-estrutura necessária para a realização desse trabalho.

Aos professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio por apoiarem a realização desse trabalho, contribuindo com conhecimento e correções do artigo científico.

Ao Valter Baura pela amizade e competência na obtenção de boas seqüências de DNA.

Aos pesquisadores Dr. Franklin Galvão do departamento de Florestas da UFPR, Dr. Gustavo Ribas Curcio e Msc. Marcos Rachwal da Embrapa Floresta, por determinarem as áreas de estudo e por auxiliarem na coleta das amostras e na compreensão ecológica dos Campos de Altitude Paranaense.

Ao Dr. Éderson da Conceição Jesus pelo auxílio nas análises ecológicas e estatísticas, pelo desprendimento, amizade, incentivo e confiança.

À professora Dr^a Carolina Weigert Galvão pelo incentivo e auxílio em todas as etapas desse trabalho.

Ao Dr. Franklin Galvão por me contaminar com o seu amor pelos Campos de Altitude Paranaense.

A Dr^a Thaís Weigert Bressan pela correção gramatical e ortográfica dessa tese.

À Julieta Pie, Marilza Lamour, Roseli Prado pela competência nas suas atribuições e carinho maternal.

Ao grupo de discussão sobre Biodiversidade e Metagenômica.

A todos os amigos de laboratório do NFN/UFPR e da UEPG.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação e professores do departamento de Bioquímica da UFPR.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

FAMILIAR

À minha mãe pelo exemplo de perseverança, superação e humildade que foram essenciais para a minha formação profissional e pessoal.

Ao meu pai por elevar o significado da palavra avô e me dar a tranqüilidade necessária para nunca desistir dos estudos.

Ao meu irmão por ter me influenciado na escolha pela Biologia e por acreditar mais em mim do que eu mesmo.

Às famílias Mazer e Etto pelo carinho e apoio, em especial aos meus pais e ao meu irmão pelo amor, incentivo e confiança.

À família Weigert-Galvão pelo carinho e apoio, em especial à Maninha e ao Kila pela confiança, dedicação e ensinamentos.

À minha melhor amiga e esposa Carolina pelo exemplo de profissional e mãe, pela dedicação à nossa família, por me apoiar e me incentivar em todos os momentos, pela paciência, pela confiança, pelo seu amor e por me permitir acordar todos os dias ao seu lado.

À Letícia por me ajudar a crescer e ter sido o combustível para a continuidade dos estudos.

À Isabela por ter me tornado “flex”, aumentando ainda mais a minha ambição pelos estudos.

Às minhas filhas por terem me presenteado com o título de pai e servirem de inspiração para tudo o que faço.

“ O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar.”
Albert Einstein

SUMÁRIO

TERMO DE APROVAÇÃO.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 TURFEIRAS.....	1
1.1.1 TURFEIRAS DOS CAMPOS DE ALTITUDE PARANAENSES	2
1.2 ECOLOGIA DOS PROCARIOTOS NO SOLO	5
1.2.1 O GENE <i>SSU rRNA</i> NO ESTUDO DA DIVERSIDADE PROCARIÓTICA.....	8
1.2.2 ESTUDO DE COMUNIDADES PROCARIÓTICAS INDEPENDENTES DE CULTIVO.....	12
2.0 OBJETIVOS	15
2.1 GERAL.....	15
2.2 ESPECÍFICOS	15
3.0 JUSTIFICATIVA.....	16
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DAS TURFEIRAS DOS CAMPOS DE ALTITUDE PARANAENSES	17
4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DAS TURFEIRAS	18
4.3 MANIPULAÇÃO DE DNA	18
4.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>SSU rRNA</i>	19
4.5 ANÁLISES DE ARDRA.....	20
4.6 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> E SEQUENCIAMENTO DO DNA	20
4.6.1 HOSPEDEIRO E PLASMÍDEO	20
4.6.2 CLONAGEM DO GENE <i>SSU rRNA</i>	21
4.6.3 PREPARO DE CÉLULAS QUIMICAMENTE COMPETENTES	21
4.6.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	22
4.6.5 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PLACAS DE 96 POÇOS	22
4.6.6 SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>SSU rRNA</i>	22
4.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>SSU rRNA</i>.....	24
4.7.1 EDIÇÃO E GERAÇÃO DE SEQUÊNCIAS CONSENSO	24
4.7.2 REMOÇÃO DAS SEQUÊNCIAS QUIMÉRICAS	24
4.8 SUBMISSÃO DAS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> PARA O GENBANK.....	26
4.9 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E OBTENÇÃO DE MATRIZES DE DISTÂNCIA.....	26
4.10 COMPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE <i>BACTERIA</i> E <i>ARCHAEA</i>.....	27
4.11 DISTRIBUIÇÃO DAS OTU_{0.03} ENTRE AS BIBLIOTECAS	29
4.12 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>SSU rRNA</i>.....	29

4.13 INDÍCES ECOLÓGICOS.....	30
4.14 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	30
5.0 RESULTADOS.....	31
5.1 CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS COMUNIDADES PROCARIÓTICAS E DO SOLO.....	31
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS DAS TURFEIRAS DOS CAMPOS DE ALTITUDE PARANAENSES	34
5.2.1 SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NÃO QUIMÉRICAS DO GENE SSU <i>rRNA</i> DE <i>BACTERIA</i>	34
5.2.2 ANÁLISE DE COBERTURA DOS DIFERENTES NÍVEIS TAXONÔMICOS BACTERIANOS	35
5.2.3 COMPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DO GENE SSU <i>rRNA</i> BACTERIANO	41
5.2.4 CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS TÁXONS BACTERIANOS.....	45
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES DE <i>ARCHAEA</i> DAS TURFEIRAS DOS CAMPOS DE ALTITUDE PARANAENSES.....	52
5.3.1 SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NÃO QUIMÉRICAS DO GENE SSU <i>rRNA</i> DE <i>ARCHAEA</i>	52
5.3.2 ANÁLISE DE COBERTURA PARA DIFERENTES NÍVEIS TAXONÔMICOS DE <i>ARCHAEA</i>	53
5.3.3 COMPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DO GENE SSU <i>rRNA</i> DE <i>ARCHAEA</i>	59
5.3.4 CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS TÁXONS DE <i>ARCHAEA</i>	62
5.4 DIVERSIDADE PROCARIÓTICA DAS TURFEIRAS DOS CAMPOS DE ALTITUDE PARANAENSES	68
6.0 DISCUSSÃO	70
7.0 CONCLUSÕES	80
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APÊNDICES	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES FITOGEOGRÁFICAS DO ESTADO DO PARANÁ.....	4
FIGURA 2	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO BIOGEOQUÍMICO DO CARBONO NO SOLO.....	7
FIGURA 3	- MODELO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO TRANSCRITO DO GENE <i>SSU rRNA</i>	11
FIGURA 4	- COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES AMOSTRAGENS DE ORGANOSSOLO POR ARDRA.....	33
FIGURA 5	- HISTOGRAMA DAS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> DE <i>BACTERIA</i>	38
FIGURA 6	- CURVAS DE RAREFAÇÃO DE ESPÉCIES E GÊNEROS BACTERIANOS.....	39
FIGURA 7	- CURVAS DE RAREFAÇÃO DE CLASSES E FILOS BACTERIANOS.....	40
FIGURA 8	- AGRUPAMENTO DAS BIBLIOTECAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> DE <i>BACTERIA</i>	44
FIGURA 9	- DISTRIBUIÇÃO DAS OTU _{0.03} DE <i>BACTERIA</i>	47
FIGURA 10	- PORCENTAGEM DE DISTRIBUIÇÃO DE FILOS BACTERIANOS.....	49

FIGURA 11 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE <i>ACIDOBACTERIA</i>	50
FIGURA 12 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE <i>PROTEOBACTERIA</i>	51
FIGURA 13 -	HISTOGRAMA DAS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> DE <i>ARCHAEA</i>	55
FIGURA 14 -	CURVAS DE RAREFAÇÃO DE <i>ARCHAEA</i> PARA NÍVEIS DE ESPÉCIE E GÊNERO.....	56
FIGURA 15 -	CURVAS DE RAREFAÇÃO DE <i>ARCHAEA</i> PARA NÍVEIS DE CLASSE E FILO.....	57
FIGURA 16 -	CURVAS DE RAREFAÇÃO DE OTU _{0.03} DE <i>BACTERIA</i> E DE <i>ARCHAEA</i>	58
FIGURA 17 -	AGRUPAMENTO DAS BIBLIOTECAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> DE <i>ARCHAEA</i>	61
FIGURA 18 -	PORCENTAGEM DE DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS DE <i>ARCHAEA</i>	63
FIGURA 19 -	DISTRIBUIÇÃO DAS OTU _{0.03} DE <i>ARCHAEA</i>	64
FIGURA 20 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE METANOGÊNICAS.....	66
FIGURA 21 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE <i>CRENARCHAEOTA</i>	67
FIGURA 22 -	PERFIL DE DIVERSIDADE DE RENYI DAS COMUNIDADES PROCARIÓTICAS.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS..	18
TABELA 2	- OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO.....	19
TABELA 3	- ESTIRPE E PLASMÍDEO UTILIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> .	21
TABELA 4	- VALORES DE pH E CONTEÚDO DE MATÉRIA ORGÂNICA DOS ORGANOSSOLOS DAS TURFEIRAS.....	31
TABELA 5	- MODELOS DE SUBSTITUIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS USADOS PARA GERAR A MATRIZ DE DISTÂNCIA GENÉTICA BACTERIANA.....	37
TABELA 6	- COMPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> DE BACTÉRIA PELO PROGRAMA J-LIBSHUFF.....	42
TABELA 7	- CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS OTU _{0.03} DE <i>BACTÉRIA</i> COMPARTILHADAS ENTRE AS BIBLIOTECAS	48
TABELA 8	- MODELOS DE SUBSTITUIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS USADOS PARA GERAR A MATRIZ DE DISTÂNCIA GENÉTICA DE <i>ARCHAEA</i>	54
TABELA 9	- COMPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> DE <i>ARCHAEA</i> PELO PROGRAMA J-LIBSHUFF.....	60
TABELA 10	- CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS OTU _{0.03} DE <i>ARCHAEA</i> COMPARTILHADAS ENTRE AS BIBLIOTECAS	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ARDRA	-	Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (do inglês, <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>)
BSA	-	Albumina do Soro Bovino (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
D. O.	-	Densidade Óptica
DGGE	-	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (do inglês, <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>DeoxiriboNucleic Acid</i>)
ha	-	hectare
OTU	-	Unidade Taxonômica Operacional (do inglês, <i>Operational Taxonomic Unit</i>)
pb	-	pares de bases
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RDP	-	Projeto do Banco de Dados Ribossômico (do inglês, <i>Ribosomal Database Project</i>)
RNA	-	Ácido Ribonucleico (do inglês, <i>RiboNucleic Acid</i>)
rpm	-	rotações por minuto
SSCP	-	Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (do inglês, <i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>)
SSU rRNA	-	Subunidade Menor do RNA ribossômico (do inglês, <i>Small SubUnit ribosomal RNA</i>)
T-RFLP	-	Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição Terminal (do inglês, <i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)

RESUMO

As turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses são ecossistemas essenciais para a manutenção da Mata Atlântica, um dos 25 *hot-spots* de biodiversidade no mundo. Neste trabalho, a distribuição e composição das comunidades procarióticas de quatro amostras de organossolo de três turfeiras distintas foram analisadas por ARDRA e pelo sequenciamento do gene *SSU rRNA*. Análises das sequências do *SSU rRNA* mostraram a prevalência de *Acidobacteria* (38,8%) e *Proteobacteria* (27,4%) para o Domínio *Bacteria*, e *Miscellaneous Crenarchaeotal Group* (58%) e *Terrestrial Group* (24%), para o Domínio *Archaea*. Como observado em outros ecossistemas, a comunidade de *Archaea* mostrou menor riqueza do que a comunidade bacteriana. Somente 0,5% das OTU_{0.03} de *Bacteria* e 2,0% das OTU_{0.03} de *Archaea* foram compartilhadas entre as quatro bibliotecas. Curiosamente, metanogênicas não prevaleceram nessa área e menos do que 1% dos clones bacterianos foram relacionados com bactérias metanotróficas, apesar das turfeiras serem considerados potenciais ecossistemas emissores de CH₄.

ABSTRACT

The Acidic Peatland ecosystems of South Brazil are ecosystems essential for the maintenance of the Atlantic Forest, one of the 25 hot-spots of biodiversity in the world. In this work, the distribution and composition of prokaryotic communities were analyzed in four histosols of three acidic peatland regions by ARDRA and *SSU rRNA* gene sequencing. *SSU rRNA* gene sequence analysis showed the prevalence of *Acidobacteria* (38.8%) and *Proteobacteria* (27.4%) of *Bacteria* and *Miscellaneous Crenarchaeotal Group* (58%) and *Terrestrial Group* (24%) of *Archaea*. Archaeal communities showed lower richness than bacterial communities. Only 0.5% of the bacterial and 2.0% archaeal OTU_{0.03} were shared among the four libraries. Interestingly, methanogen populations did not prevail in this area and less than 1% of the bacterial clones were related to methanotrophic bacteria despite the peatlands are considered as potencial emitters of CH₄.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 TURFEIRAS¹

Turfeiras são ecossistemas terrestres em que a degradação da matéria orgânica é menor do que a sua produção principalmente devido ao alto nível da água e baixa temperatura. Na camada saturada de água, a falta de oxigênio retarda significativamente a degradação da matéria orgânica, fazendo com que resíduos de plantas acumulem-se como turfa (GORHAM, 1991).

No mundo inteiro, é estimado que as turfeiras ocupem uma área de aproximadamente 400 milhões de ha, representando 3 % da superfície da Terra. A maior parte dessa área, aproximadamente 350 milhões de ha, está presente no Hemisfério Norte, armazenando um terço da reserva global de carbono orgânico no solo (GORHAM, 1991; RIELEY *et al.*, 2008). Estima-se, portanto, que esses ecossistemas armazenem de 180 a 450 petagramas (10^{15} g) de carbono e também liberem 20 a 45 teragramas (10^{12} g) de metano por ano na atmosfera (GORHAM, 1991). No Brasil, é estimado que esses ambientes ocupem aproximadamente 611.883 ha, isto é, cerca de 0,07 % do território nacional (VALLADARES, 2003).

Essas turfeiras são compostas por uma vegetação antiga e formadas em uma condição climática que se manteve praticamente constante durante um período mínimo de 1000 anos (RICHARDSON *et al.*, 1978). Estudos usando fósseis datados em aproximadamente 11 milhões de anos indicam que esses ecossistemas foram os responsáveis pela diminuição de aproximadamente 7 partes por milhão no volume de CO₂ atmosférico, o que representa um total de 110 petagramas de carbono capturado da biosfera na primeira metade do Holoceno (MACDONALD *et al.*, 2006). Acredita-se que esta diminuição esteja relacionada ao rápido crescimento desses ecossistemas e da sua associação com a estocagem de fitomassa de carbono durante esse período (MACDONALD *et al.*, 2006).

¹ Apesar de o termo turfeira (do inglês *peatland*) ser internacionalmente utilizado para designar ecossistemas cujos solos apresentam elevados teores de matéria orgânica, essa denominação no Brasil, com base no Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, equivale aos Organossolos. No presente trabalho foi mantida a expressão turfa (ou turfeiras) para facilitar a compreensão de leitores familiarizados com publicações do Hemisfério Norte.

Na maioria desses ecossistemas encontram-se musgos do gênero *Sphagnum*, uma briófita composta de aproximadamente 300 espécies, distribuídas no mundo inteiro, sendo um componente dominante em vegetações de turfeiras (DANIELS e EDDY, 1985). A importância ecológica e ambiental do *Sphagnum* nesses ecossistemas se deve principalmente a sua simbiose com bactérias endofíticas metanotróficas, em que a oxidação do metano contribui para o processo de fixação fotossintética de carbono pela planta, representado na equação abaixo (RAGHOEBARSING *et al.*, 2005; LARMOLA *et al.*, 2010).

Oxidação do metano: $\text{CH}_4 + 2 \text{O}_2 = \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$

Fixação do carbono: $2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} = 2 \text{CH}_2\text{O} + 2 \text{O}_2$

Balanco: $\text{CH}_4 + \text{CO}_2 = 2 \text{CH}_2\text{O}$

Turfeiras com *Sphagnum* são habitats únicos para a maioria das plantas e animais, sendo um ambiente extremo para os microrganismos devido a sua alta acidez (pH 3,5-5,0) e baixíssima concentração de nutrientes minerais (RICHARDSON *et al.*, 1978). Devido a sua importância ecológica para a preservação de diversas espécies endêmicas e a manutenção de outros ecossistemas, em 2002, o Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas lançou o projeto: *Wetland Ecosystem and Tropical Peat Swamp Forest Rehabilitation Project*, com o intuito de preservar essas regiões (MACDONALD *et al.*, 2006).

No sul do Brasil, a presença do *Sphagnum* nas turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses reproduz uma condição muito similar à descrita anteriormente, no entanto, ao contrário do que acontece no hemisfério norte, esses ecossistemas são pouco estudados e compreendidos.

1.1.1 TURFEIRAS DOS CAMPOS DE ALTITUDE PARANAENSES

No Estado do Paraná, em relação a sua fisiografia, são encontrados, de leste para o oeste, a Planície Costeira, a Serra do Mar, o Primeiro Planalto (ou Planalto de Curitiba), o Segundo Planalto (ou Planalto de Ponta Grossa) e, finalmente, o Terceiro Planalto (ou Planalto de Guarapuava), o qual se estende até

as margens do rio Paraná. A transição do Primeiro para o Segundo Planalto é definida pela Escarpa Devoniana e a do Segundo para o Terceiro Planalto pela Serra Geral (MAACK, 1968). Em quatorze por cento da superfície do estado encontram-se áreas de Estepe (Campos de Altitude), entremeadas por capões, florestas de galeria e turfeiras distribuídas nas porções mais elevadas dos três planaltos (RODERJAN *et al.*, 2002) (FIGURA 1). Embora possam estar em litologias e geomorfologias diversas, as turfeiras apresentam uma vegetação muito similar desempenhando importante papel biológico por abrigarem uma fauna diversa, serem importantes fixadores de carbono no solo e determinantes na filtragem e regularização dos fluxos hídricos das principais bacias hidrográficas do sul do Brasil. Turfeiras com tais características são encontradas nos Campos das cimeiras da Serra do Mar, nos Campos de Curitiba situados no Primeiro Planalto, nos Campos Gerais pertencentes ao Segundo Planalto e nos Campos de Palmas e de Guarapuava, ambos presentes nas bordas do Terceiro Planalto (CURCIO, dados não publicados).

Por se encontrarem em terrenos hidromórficos, ou seja, na presença constante de água e ausência de oxigênio, a taxa de decomposição nessas turfeiras é baixa e conseqüentemente pouco CO₂ é perdido para a atmosfera. Desta forma restos vegetais ali depositados são rapidamente estocados e o solo formado é basicamente de matéria orgânica, sendo denominado de organossolo (EMBRAPA, 1999). Tais características têm permitido o acúmulo de camadas de matéria orgânica ao longo dos anos, possibilitando assim a datação e a determinação da cobertura vegetal de épocas relictuais (BEHLING, 2002).

Apesar da sua importância biológica na manutenção de outros ecossistemas e da sua função ímpar como reservatório de informação pretérita, poucos desses ecossistemas encontram-se protegidos dentro de unidades de preservação. A maioria desses ambientes é constantemente ameaçada pela introdução de espécies fanerógamas exóticas como o *Pinus* e pelas queimadas periódicas, necessárias para o avanço da agricultura e das pastagens extensivas (MORO *et al.*, 1996; ZILLER, 2000; TAKEDA, TAKEDA e FARAGO, 2001). A destruição da matéria orgânica pela ação do fogo diminui a taxa de ciclagem de nutrientes e reduz a capacidade de retenção d'água, conduzindo esses solos à esterilidade (BODZIAK e MAACK, 2001). Essas ameaças, além de modificarem a fauna e a flora local, causam ainda a extinção de microrganismos presentes no solo, alterando os processos

biogeoquímicos responsáveis pela manutenção desses ecossistemas (O'DONNELL e GÖRRES, 1999; TIMOTHY, 2002). Alguns desses microrganismos realizam funções que são específicas para o ecossistema e perdem a sua finalidade quando o ecossistema se modifica (MARKHAM *et al.*, 1993).

A ausência de informação microbiológica desses solos somada à falta de políticas de preservação desses ecossistemas impulsionaram o presente estudo sobre a diversidade procariótica das turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses.

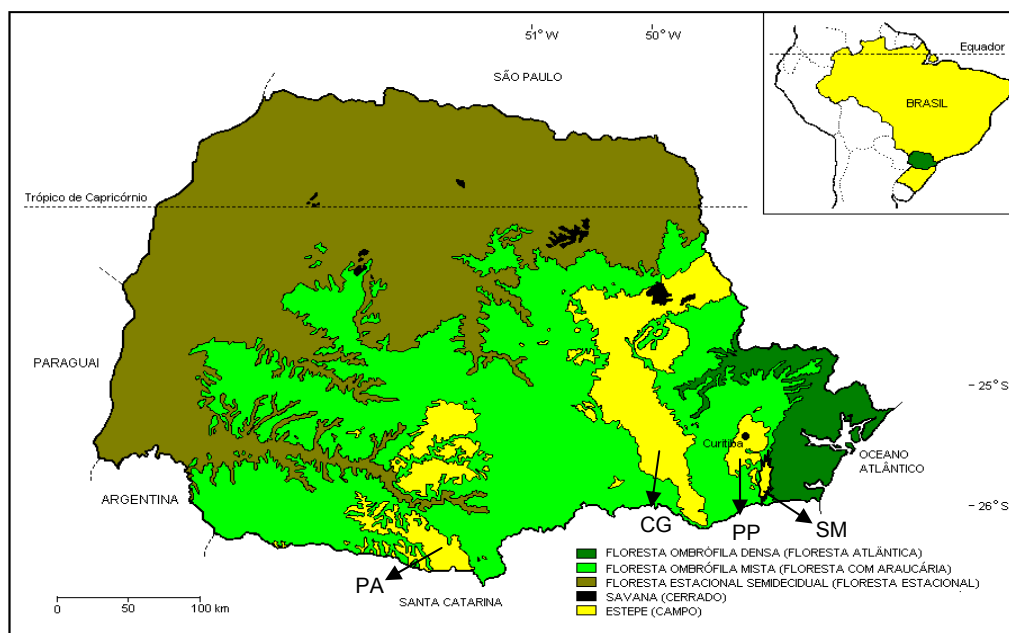


FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES FITOGEOGRÁFICAS DO ESTADO DO PARANÁ. As setas no mapa indicam a posição fisiográfica dos Campos de Altitude (esteques). SM = Serra do Mar, PP = Primeiro Planalto, CG = Segundo Planalto e PA = Terceiro Planalto.
FONTE: MAACK (1968) modificado.

1.2 ECOLOGIA DOS PROCARIOTOS NO SOLO

O solo é um sistema biológico complexo e dinâmico que integra fatores abióticos e diversas comunidades microbianas. Muitos pesquisadores têm se dedicado ao estudo tanto das relações entre a diversidade genética e a estrutura das comunidades quanto das relações entre a estrutura das comunidades e as suas funções no solo. A grande preocupação dos estudos correntes está em caracterizar a diversidade no intuito de entender o funcionamento dos ecossistemas e compreender se a habilidade em resistir a sérios distúrbios depende em parte da diversidade microbiológica destes sistemas (NANNIPIERI *et al.*, 2003). Acredita-se que um número mínimo de espécies seja essencial para o funcionamento dos ecossistemas sob condições normais e que um grande número de espécies seja provavelmente necessário para a manutenção de processos estáveis diante de mudanças do ambiente (LOREAU *et al.*, 2001).

O solo é fundamental e governa a produtividade das plantas em ecossistemas terrestres, mantendo os ciclos biogeoquímicos devido à ação dos microrganismos. Apesar de o solo ser habitado por populações que incluem a macrofauna, mesofauna, microfauna e microflora, estima-se que 80-90% dos processos que ocorrem no solo, incluindo a reciclagem de nutrientes, sejam mediados por microrganismos. Sem a ciclagem desses elementos a continuidade da vida na Terra seria impossível, considerando-se que nutrientes essenciais capturados pelos organismos deixariam de estar na forma assimilável. Desta forma características bioquímicas e microbianas são empregadas como potenciais indicadores da qualidade do solo (NANNIPIERI *et al.*, 2003).

A importância de certos microrganismos na ciclagem de nutriente depende em parte da característica do solo estudado. Nas turfeiras de *Sphagnum* do Hemisfério Norte, regiões tidas como potenciais emissores de metano, foram caracterizados inicialmente microrganismos metanotróficos (DEDYSH *et al.*, 1988a, 1998b, 2000, 2001, 2002, 2004, 2007; MORRIS *et al.*, 2002) e metanogênicos (BASILIKO *et al.*, 2003; HORN *et al.*, 2003; KOTSYURBENKO *et al.*, 2004; SIZOVA *et al.*, 2003). Posteriormente, outros membros da comunidade procariótica foram também caracterizados (PANKRATOV e DEDYSH, 2010; KULICHEVSKAYA *et al.*,

2006a, 2006b, 2009, 2010a, 2010b; PANKRATOV *et al.*, 2006, 2007; VANDAMME *et al.*, 2007; DOROSHENKO *et al.*, 2007; BELOVA *et al.*, 2006; ALBERT *et al.*, 2005).

A produção do metano é uma das etapas que compõem o ciclo do carbono. Na ciclagem do carbono plantas e microrganismos fotossintetizantes convertem carbono inorgânico em compostos orgânicos (1) e fornecem nutrientes para outros organismos que agem como consumidores de carbono, quebrando matéria orgânica nos processos de respiração e fermentação, resultando na liberação de CO₂ (2). Na etapa final do processo global de degradação anaeróbica de compostos orgânicos, arqueas metanogênicas são responsáveis pela produção de metano (3), que pode ser utilizado como fonte de energia e carbono para bactérias metanotróficas (4), gerando açúcares e aminoácidos, contribuindo também para a ciclagem de compostos carbônicos (DEDYSH, 2002) (FIGURA 2).

Waksman (1927) sugeriu que parâmetros biológicos são mais confiáveis para avaliar a qualidade do solo do que parâmetros físicos e químicos, já que o que distingue o solo de outras formações geológicas é justamente a sua atividade biológica, a qual é dependente da diversidade de microrganismos nele existente (VARGAS e HUNGRIA, 1997). Porém estima-se que apenas 1% dos microrganismos existentes foram identificados por serem passíveis de cultivo, permanecendo os outros 99% desconhecidos até o momento (TORSVIK e OVREAS, 2002). Estima-se que 1 g de solo pode conter cerca de 10 bilhões de microrganismos, compreendendo milhares de espécies diferentes, a maioria pertencendo aos domínios *Bacteria* e *Archaea* (ROSSELLÓ-MORA e AMANN, 2001). Apesar da inexistência de meios de cultivo apropriados para a caracterização fenotípica da maioria dos microrganismos presentes no solo, a utilização do gene *SSU rRNA* como marcador molecular tem possibilitado a compreensão das comunidades de bactérias e arqueas em diferentes tipos de ecossistemas.

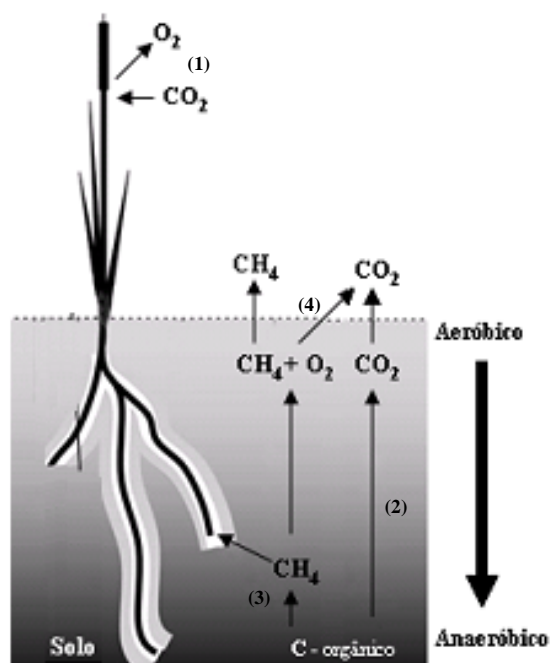


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO BIOGEOQUÍMICO DO CARBONO NO SOLO. Esquema representando os principais passos da ciclagem do carbono no solo: (1) Consumo do CO_2 pela fotossíntese; (2) Produção de CO_2 através da respiração e fermentação da matéria orgânica; (3) Produção de CH_4 pela degradação anaeróbica da matéria orgânica; (4) Oxidação do CH_4 a CO_2 .

FONTE: GUTKNECHT *et al.* (2006) modificado.

1.2.1 O GENE *SSU rRNA* NO ESTUDO DA DIVERSIDADE PROCARIÓTICA

Nas últimas duas décadas tem crescido muito o interesse na compreensão das comunidades procarióticas que controlam o funcionamento dos ecossistemas de solos hidromórficos, especialmente em relação à decomposição de matéria orgânica, metanotrofia e metanogênese. No entanto devido à limitação das técnicas tradicionais de cultivo para a detecção dessa diversidade, a utilização da sequência do gene *SSU rRNA* para a identificação e caracterização da estrutura dessas comunidades tem sido amplamente explorada (GUTKNECHT *et al.*, 2006).

Diferente dos padrões fenotípicos que são tridimensionais e geram subjetividade com relação a sua similaridade ou mesmo identidade, uma sequência gênica possui apenas uma dimensão, em que os elementos são restritos em número e bem definidos, sendo, portanto, passíveis de julgamento objetivo e determinado por relações matemáticas (WOESE, 1987). O advento do sequenciamento de ácidos nucleicos na década de 70 forneceu uma nova e poderosa ferramenta para medir relações evolutivas. Para a identificação e a classificação dos organismos, a informação genotípica obtida através de sequências de marcadores moleculares apresenta vantagens em relação à informação fenotípica. A informação genotípica gera uma interpretação mais rápida, confiável e precisa e ainda é mais informativa sobre as relações evolutivas (WOESE, 1987).

Como são essencialmente lineares, contêm milhares de caracteres independentes e existem em grande número (variando em tamanho e composição), as similaridades entre as sequências dos marcadores moleculares indicam uma origem comum dos genes correspondentes e podem ser usadas para a construção de genealogias moleculares e para identificação de microrganismos independentes de cultivo (LUDWIG e SCHLEIFER, 1994; PACE *et al.*, 1986).

Dentre os marcadores moleculares filogenéticos, o gene *SSU rRNA* tornou-se o marcador universal para procariotos, apresentando quase 2 milhões de sequências disponíveis em banco de dados, segundo o *Ribosomal Database Project-II* (disponível no sítio: <http://www.rdp.cme.msu.edu>, acessado em 21/08/2011), o que atualmente permite uma vasta gama de comparações.

O transcrito do gene *SSU rRNA* é uma das moléculas que compõem, juntamente com proteínas, a subunidade menor do ribossomo nos domínios *Archaea* e *Bacteria*. Por possuir uma distribuição universal, estrutura e função conservadas entre os táxons e um número de nucleotídeos suficiente para o aparecimento de divergências na sequência, esta molécula apresenta todas as características necessárias a um marcador molecular ideal. Sua estrutura primária possui 9 regiões variáveis, denominadas de V1 a V9, que podem ser usadas para estudar as relações evolutivas entre dois microrganismos muito próximos, alternadas com regiões conservadas, utilizadas para revelar relações antigas entre duas macromoléculas (WOESE *et al.*, 1983).

Em *E. coli*, as sequências hipervariáveis de V1 a V9 ocupam as regiões entre os nucleotídeos 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 e 1435-1465, respectivamente (BROSIUS *et al.*, 1978; CHAKRAVORTY *et al.*, 2007). Estas regiões hipervariadas do gene *SSU rRNA* exibem diferentes graus de diversidade na sequência e não há nenhuma região capaz de distinguir todos os táxons bacterianos com o mesmo poder discriminatório. Por exemplo, a região V1 tem se mostrado eficiente na distinção de espécies de *Staphylococcus*, enquanto V2 distingue melhor espécies de *Mycobacteria*, V3 espécies de *Haemophilus* e V6 espécies de *Bacillus* (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007). Entretanto, em algumas espécies a região V2 apresenta grande variação quando há mais de uma cópia do gene *SSU rRNA* no genoma, como observado em *E. coli*, com 7 cópias do gene *SSU rRNA* no genoma (BLATTNER *et al.*, 1997; BROSIUS *et al.*, 1981; SCHMALENBERGER *et al.*, 2001). De forma geral, as regiões V2-V3 foram úteis na determinação dos táxons das comunidades bacterianas (LIU *et al.*, 2007), além de sutis na distinção ao nível de gênero (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007; PETROSINO *et al.*, 2009). As regiões V4-V5 também têm se mostradas úteis para análises de comunidades microbianas complexas, uma vez que há pouca variação dessa região nas cópias do gene *SSU rRNA* de um mesmo organismo (SCHMALENBERGE *et al.*, 2001) (FIGURA 3).

O estudo da estrutura primária dos genes de RNA ribossômico transformou a taxonomia microbiana em um sistema estruturado de sistemática baseada na história evolutiva dos organismos (OLSEN, WOESE e OVERBEEK, 1994). Utilizado inicialmente por Fox e Woese há 34 anos e posteriormente por Pace, Olsen, Giovannoni e Ward, a sequência do gene *SSU rRNA* tornou-se padrão na

determinação de relações filogenéticas e na avaliação da diversidade em amostras ambientais independentes de cultivo (FOX *et al.*, 1977; PACE *et al.*, 1986; OLSEN *et al.*, 1986; GIOVANNONI *et al.*, 1988; WARD *et al.*, 1990).

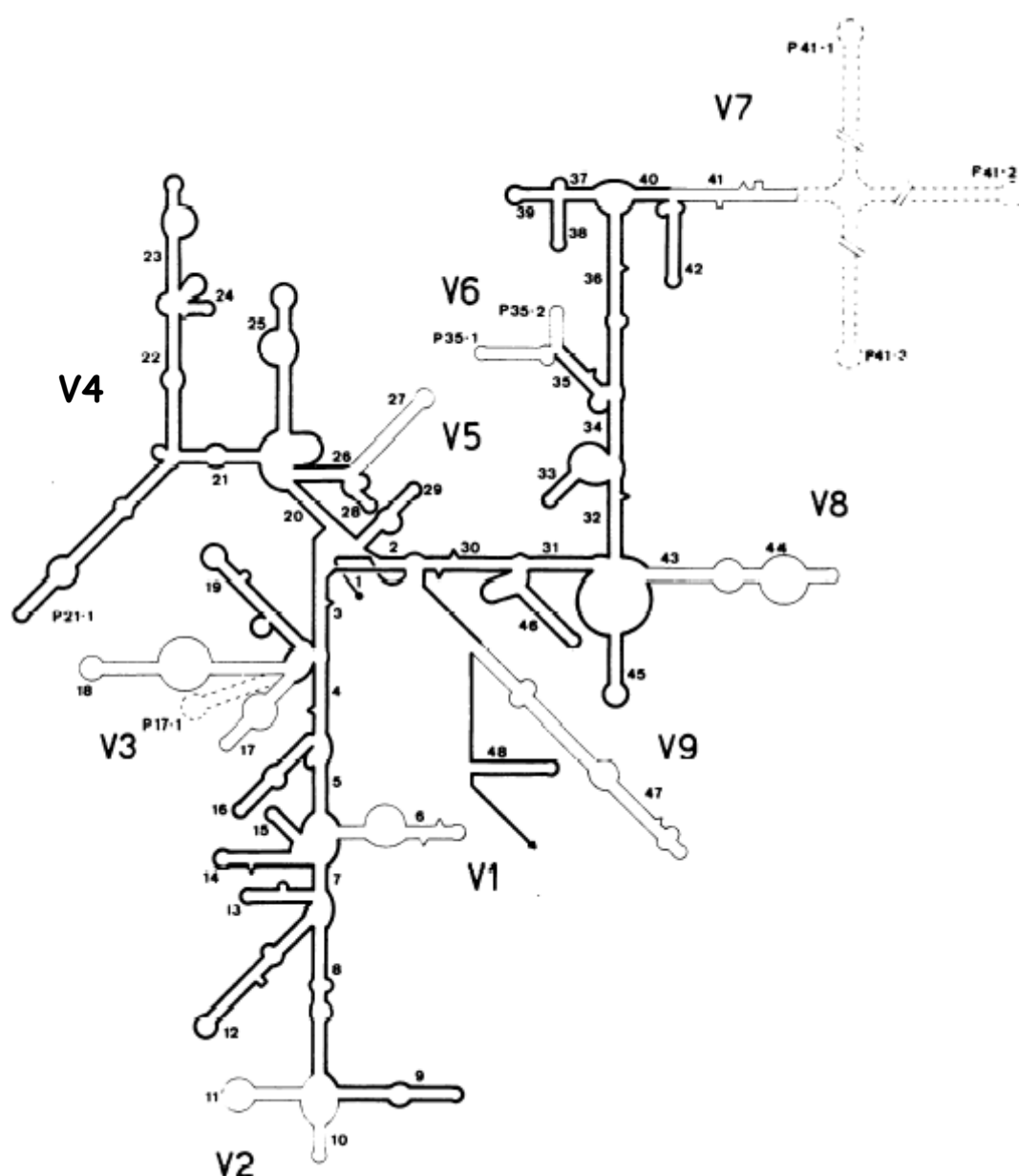


FIGURA 3 - MODELO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO TRANSCRITO DO GENE *SSU rRNA*. As hélices são numeradas de acordo com a ocorrência a partir da extremidade 5' (seta preta). Hélices assinaladas apenas por números são características de procariotos e eucariotos. Hélices cujo número é precedido por 'P' são exclusivas de procariotos. Hélices que apresentam números hifenados representam bifurcações de uma hélice principal. As linhas mais escuras representam regiões mais conservadas e as linhas mais finas representam regiões variáveis (V1 a V9). Hélices em linha pontilhada são raras. A sequência do gene *SSU rRNA* do domínio *Archaea* segue o mesmo padrão geral de *Bacteria* com exceção da hélice 35 que não é ramificada, sendo esta uma característica do domínio *Eukarya*.

FONTE: DAMS *et al.* (1988)

1.2.2 ESTUDO DE COMUNIDADES PROCARIÓTICAS INDEPENDENTES DE CULTIVO

A necessidade de se entender a variabilidade espacial e temporal da estrutura das comunidades microbianas em resposta às atividades antrópicas estimulou os pesquisadores a desenvolver diferentes métodos moleculares independentes de cultivo que diferem principalmente em relação ao custo, ao tempo de análise e principalmente ao poder discriminatório (MUYZER e SMALLA, 1998; FORNEY, ZHOU e BROWN, 2004; KIRK *et al.*, 2004). Baseados na variação das sequências do gene *SSU rRNA*, os pesquisadores têm utilizado como método para a obtenção de um rápido perfil das comunidades a técnica de ARDRA (do inglês, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Para essa análise, os produtos da amplificação por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) do gene *SSU rRNA* são digeridos com enzimas de restrição e posteriormente separados em gel de eletroforese. Desta forma, diferentes sequências de DNA são clivadas em diversos pontos resultando em um perfil único da comunidade estudada (MALIK *et al.*, 2008). No entanto, apesar de essa análise ser relativamente simples, rápida e de baixo custo, ela é incapaz de determinar de forma precisa a diversidade microbiana ou de detectar grupos filogeneticamente específicos de uma comunidade em um perfil de restrição (LIU *et al.*, 1997). Devido a essa limitação, a ARDRA tem sido combinada com outras técnicas moleculares para caracterização de comunidades microbianas (WATTS *et al.*, 2001; HAACK *et al.*, 2004), sendo utilizada em ensaios preliminares para ajustes metodológicos (SCHWARZENBACH *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, técnicas moleculares como DGGE (do inglês, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (MUYZER *et al.*, 1993), T-RFLP (do inglês, *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) (LIU *et al.*, 1997) e SSCP (do inglês, *Single-Strand Conformation Polymorphism*) (SCHWIEGER e TEBBE, 1998) tornaram-se importantes ferramentas para se estudar a ecologia microbiana através de técnicas independentes de cultivo. Essas técnicas de *fingerprint* fornecem informações sobre a diversidade e a dinâmica dos ribotipos (organismos detectados pelo marcador *SSU rRNA*) na amostra ambiental de forma relativamente rápida e com uma resolução superior à obtida por ARDRA. Entretanto tais técnicas não

permitem uma ampla identificação taxonômica dos microrganismos presentes em um habitat complexo como os solos (DUNBAR *et al.*, 2000; GANS *et al.*, 2005).

A perspectiva de uma vasta diversidade de microrganismos não-cultiváveis no solo estimulou o aprimoramento das técnicas de extração de DNA (TORSVIK, 1980), de PCR (SAIKI *et al.*, 1988) e de sequenciamento de DNA (SANGER *et al.*, 1977). Devido a mudanças nos protocolos de purificação de DNA do solo, atualmente é necessário apenas um grama de solo (OGRAM, 2000), quase 90 vezes menos quantidade de solo exigida há 30 anos (TORSVIK, 1980). Além disso, pouco tempo atrás, o alto custo do sequenciamento de DNA e a falta de material para a construção de bibliotecas genômicas dificultavam ainda mais a identificação de microrganismos não cultiváveis. No entanto o melhoramento na tecnologia de clonagem e sequenciamento diminuiu consistentemente a quantidade de material inicial necessário para a construção das bibliotecas, tornando o sequenciamento do gene *SSU rRNA* uma poderosa ferramenta para a identificação mais precisa de microrganismos incultiváveis do solo (TRINGE e ROBIN, 2005).

Nestes estudos, o DNA é extraído diretamente do solo e os genes *SSU rRNA* são amplificados usando PCR. Os produtos de PCR são clonados em vetores e sequenciados, produzindo sequências do gene *SSU rRNA* referentes aos microrganismos presentes na amostra de solo. Por fim, a comparação destas sequências com banco de dados de genes *SSU rRNA* permite sua identificação taxonômica (AMANN *et al.*, 1995; THERON e CLOETE, 2000).

Todos os métodos citados são dependentes da amplificação de genes por PCR e consequentemente estão sujeitos às limitações dessa técnica. A amplificação de um gene é dependente do método e da qualidade do DNA extraído, onde lises não muito brandas de células podem resultar na extração preferencial de DNA de bactérias Gram-negativas (WINTZINGERODE *et al.*, 1997). Em uma purificação de DNA de baixa qualidade, a eficiência da PCR pode ser severamente reduzida pela presença de substâncias inibitórias que são coextraídas com ácidos nucleicos, incluindo ácido húmico e partículas de argila (KIRK *et al.*, 2004). Os métodos empregados para coletar, transportar e o tempo de estocagem da amostra antes da extração do DNA podem ainda alterar a composição microbiana e introduzir tendências nas análises subsequentes das comunidades nativas por PCR (SCHNEEGURT *et al.*, 2003; JACKSON *et al.*, 1998; WINTZINGERODE *et al.*, 1997). Amplificações de diferentes genes alvos, como *SSU rRNA*, podem ainda

introduzir tendências no estudo de diversidade, quando sequências de DNA com baixo conteúdo de guanina e de citosina são desnaturadas mais eficientemente durante a PCR e, portanto, podem ser preferencialmente amplificados (WINTZINGERODE *et al.*, 1997). Além disso, alguns produtos de amplificação podem ser resultados da formação de produtos quiméricos durante a PCR (LIESACK *et al.*, 1991). Trata-se, portanto, de uma técnica limitada e que em alguns casos pode produzir sinais falsos positivos ou falsos negativos devido à contaminação (SPIEGELMAN *et al.*, 2005). No entanto, apesar das desvantagens, as metodologias baseadas em PCR apresentam-se como os métodos mais eficientes no estudo de comunidades procarióticas por serem independentes de cultivo e têm proporcionado um enorme avanço no estudo de comunidades microbianas em ambientes diversos, como solo, tecido de plantas, sedimentos marinhos etc. (MALIK *et al.*, 2008).

2.0 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinar a biodiversidade procariótica das turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses através do sequenciamento do gene *SSU rRNA*.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1.Extrair e purificar o DNA das turfeiras da Serra do Mar, Segundo e Terceiro Planalto;
- 2.Construir e sequenciar bibliotecas do gene *SSU rRNA* do Domínio *Bacteria* e *Archaea*;
- 3.Classificar taxonomicamente os genes *SSU rRNA*;
- 4.Determinar a riqueza, a diversidade e a distribuição geográfica dos táxons encontrados;
- 5.Correlacionar as comunidades microbianas com as características abióticas e bióticas dos ecossistemas citados.

3.0 JUSTIFICATIVA

As turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses são ecossistemas relictuais que permaneceram sob condições constantes por mais de 1.000 anos (BEHLING, 2002). Essas turfeiras desempenham papéis ecológicos singulares e de vital importância para a manutenção do Bioma Mata Atlântica, um dos 25 *hot-spots* de biodiversidade mundial (MYERS *et al.*, 2000). Caracterizam-se por serem cobertas por *Sphagnum*, abrigarem uma fauna diversa, serem importantes fixadores de carbono no solo e responsáveis pela filtragem e abastecimento hídrico das principais bacias do sul do Brasil. No entanto, apesar da sua importância biológica, poucos desses ecossistemas encontram-se protegidos dentro de unidades de preservação e estão constantemente sofrendo a ação antrópica decorrente do avanço da agricultura e da pecuária.

Considerando-se que as modificações dessas turfeiras levam à extinção de diversos microrganismos porque alteram o equilíbrio dos processos bioquímicos realizados por bactérias e arqueas, é imperativa a necessidade de um levantamento microbiológico dessas áreas. No entanto não há nenhum registro de estudo microbiológico dessas turfeiras. Espera-se que esse trabalho possa contribuir para um maior entendimento microbiológico desses ecossistemas que são grandes reservatórios de carbono e potenciais emissores de metano para a atmosfera.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DAS TURFEIRAS DOS CAMPOS DE ALTITUDE PARANAENSES

Neste trabalho, organossolos foram coletados de três unidades fitogeográficas distintas dentro do Bioma Mata Atlântica: Serra do Mar (SM20), Segundo Planalto (CG20 e CG50) e Terceiro Planalto (PA20). Nessas três áreas encontram-se turfeiras preservadas. Diferenças entre esses ecossistemas estão relacionadas com o uso do solo em áreas vizinhas. A turfeira da Serra do Mar é delimitada pela Floresta Ombrófila Altomontana; a do Segundo Planalto por pastagens e a do Terceiro Planalto por solos agricultáveis. Nessas áreas o clima é temperado e úmido, sem períodos proeminentes de seca. A precipitação anual fica entre 1.400 e 2.200 milímetros. A temperatura média anual varia em torno de 12° a 18° C (BEHLING, 2002). Os organossolos dessas turfeiras são predominantemente cobertos com *Sphagnum*, mas contêm também espécies das famílias *Poaceae* e *Cyperaceae* e pequenos arbustos das famílias *Asteraceae*, *Melastomataceae*, *Ericaceae*, *Eriocaulaceae* e *Verbenaceae* (SAFFORD, 1999). Por se tratar de um organossolo muito fibroso, um aparelho coletor de solo foi desenvolvido especialmente para este estudo (ANEXO 1). Para cada turfeira estudada foram coletadas aleatoriamente 25 amostras de organossolos dentro de uma área de aproximadamente 500 m². Para cada amostra de aproximadamente 0,5 kg, 100 mg foram coletados em tubos tipo Falcon e mantidos no gelo até a chegada ao laboratório para as análises microbiológicas. O restante das amostras foi acondicionado separadamente em sacos plásticos, secado à temperatura ambiente e peneirado em peneira com malha de 2 mm. Posteriormente as amostras foram enviadas para o Departamento de Solos e Engenharia Agrícola (UFPR) para análises químicas. As coordenadas geográficas e as características das áreas amostradas estão listadas na TABELA 1.

TABELA 1 - LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS

Amostra	Posição Fisiográfica	Longitude (m)	Latitude (m)	Altitude (a.s.m*)	Profundidade coletada ** (cm)
SM20	Serra do Mar	704624,750	7134707,394	1418,6	20
CG20	Segundo Planalto	618265,070	7204223,630	1090,0	20
CG50	Segundo Planalto	618265,070	7204223,630	1089,7	50
PA20	Terceiro Planalto	430821,950	7060651,458	1258,2	20

NOTA: Estão representadas as médias das coordenadas geográficas pelo sistema UTM (do inglês, *Universal Transverse Mercator coordinate system*). * asm = acima do nível do mar. As amostras pertenceram à zona 22J da superfície da Terra. ** Todas as amostras foram coletadas em locais onde o nível d'água estava no mesmo nível da superfície do organossolo.

4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DAS TURFEIRAS

A extração do DNA do solo das turfeiras foi realizada utilizando-se o kit *Ultra Clean Soil DNA Kit* da *MOBIO Laboratories, Inc.* seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, o DNA referente a cada amostra foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm (SAMBROOK *et al.*, 1989) e diluído a uma concentração final de 10 ng.µL⁻¹ e estocado a -20° C.

4.3 MANIPULAÇÃO DE DNA

Os métodos de purificação de plasmídeos em tubos de 1,5 mL tipo Eppendorf, purificação de produtos de amplificação (PCR), clivagem do DNA com endonucleases de restrição, eletroforese em gel de ágar, agarose e poliacrilamida foram executados conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Os géis foram tratados em brometo de etídeo 0,5 µg.mL⁻¹ (Invitrogen Inc.) e o DNA foi visualizado sob luz ultra-violeta e fotografado em câmera digital (Olympus modelo C-3040ZOOM, Japão).

4.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *SSU rRNA*

Os genes da *SSU rRNA* de *Archaea* e *Bacteria* foram amplificados por reação de PCR utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores listados na tabela 2. Inicialmente 50 ng de DNA molde foi incubado com 30 µg de BSA em solução aquosa de 11 µL, por 45 minutos a 37°C (KREADER, 1996). Posteriormente foram adicionados 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (TABELA 2), 1 unidade de enzima *Taq DNA polimerase* (Invitrogen Inc.), tampão de reação diluído 10 vezes, 200 µmol/L de dideoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1,5 mmol.L⁻¹ de cloreto de magnésio, e água ultra pura estéril para um volume final de 50 µL. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Eppendorf *Master Cycler Gradient*, com um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C, 2 minutos a 72°C, e um ciclo de extensão de 10 minutos a 72°C.

TABELA 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

Domínio	Gene	Oligonucleotídeo Iniciador	Sequência	Referência
<i>Bacteria</i>	<i>SSU rRNA</i>	27F 1492R	5' AGAGTTT ^{<u>G</u>} ATC ^{<u>M</u>} TGGCTCAG 5' GGTTACCTTGT ^{<u>T</u>} TACGACTT	SUZUKI e GIOVANNONI, 1996
<i>Archaea</i>	<i>SSU rRNA</i>	21F 958R	5' TTCY ^{<u>G</u>} GGTTGATCCY ^{<u>G</u>} CC ^{<u>R</u>} GA 5' YCCGGCGTTGANT ^{<u>C</u>} CAATT	MOYER <i>et al.</i> , 1998

NOTA: As letras sublinhadas correspondem a posições degeneradas, onde: M = A + C; Y = C + T; R = A + G; N = A + G + C + T.

4.5 ANÁLISES DE ARDRA

Aproximadamente 500 ng de cada produto de PCR foram digeridos com 5 unidades da enzima de restrição *HaeIII* ou *HinfI* (MBI Fermentas) em volumes de reação de 15 μL , durante 5 horas a 37°C. Posteriormente a enzima foi inativada a 65°C por 20 minutos. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em géis nativos de poliacrilamida a 12% em tampão TAE 1X, durante 1,5 h a 100 V. A separação dos fragmentos foi realizada no sistema de eletroforese vertical Hoefer miniVE (Hoefer Pharmacia Biotech), à temperatura ambiente. Géis foram tratados com 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de brometo de etídio, durante 45 minutos. Os registros dos fragmentos dos produtos de amplificação gerados com as enzimas de restrição *HaeIII* e *HinfI* foram usados para construir uma matriz binária (presença e ausência de bandas de DNA com a mesma mobilidade no gel). Dendogramas de similaridade foram gerados pelo programa NTSYSpc (*Numerical Taxonomy of multivariate Systems*). Análises de *bootstrap* com 1.000 replicatas foram realizadas pelo programa Winboot (YAP e NELSON, 1996).

4.6 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DO GENE *SSU rRNA* E SEQUENCIAMENTO DO DNA

4.6.1 HOSPEDEIRO E PLASMÍDEO

A estirpe de bactéria DH5 α de *E. coli* foi utilizada como hospedeira dos plasmídeos derivados do pGEM-T (TABELA 3 e ANEXO 2).

TABELA 3 – ESTIRPE E PLASMÍDEO UTILIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DO GENE *SSU rRNA*

Estirpe <i>E. coli</i>	Genótipo/Fenótipo	Referência
DH5 α	F- ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk -, mk +) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -	INVITROGEN INC.
Plasmídeo	Genótipo/Fenótipo	Referência
pGEM-T <i>easy</i>	<i>lacZ, lacI, Amp^R</i>	PROMEGA

Para o cultivo bacteriano em meio líquido foi utilizado meio *Terrific Broth* (TB), Luria-Bertani (LB), SOC ou SOB, sob agitação constante a 180 rpm e a 37°C. Para cultivo em meio sólido foi utilizado meio Luria-Bertani Ágar (LA) em placas mantidas em estufa a 37°C (SAMBROOK *et al.*, 1989). De acordo com a necessidade os meios de cultura continham 250 μ g/mL de ampicilina.

4.6.2 CLONAGEM DO GENE *SSU rRNA*

A clonagem dos genes *SSU rRNA* amplificados das diferentes amostras de solo foi realizada de forma aleatória (*shotgun*) utilizando-se o kit comercial *pGEM-T Easy Vector System* (Promega), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante.

4.6.3 PREPARO DE CÉLULAS QUIMICAMENTE COMPETENTES

Uma colônia de *E. coli* DH5 α crescida em meio LA durante 16-20 horas a 37°C foi transferida para 100 mL de meio LB e incubada a 37°C, 180 rpm até a cultura atingir a DO₆₀₀ de 0,4. A suspensão de células foi mantida em banho de gelo por 10 minutos e posteriormente as células foram coletadas por centrifugação a 2.700 x *g* por 5 minutos a 4°C em centrífuga (*Eppendorf 5804R*) utilizando o rotor de ângulo fixo (modelo F 34-6-38). O precipitado de células foi lavado com 30 mL de uma solução aquosa contendo 20 mM de CaCl₂ e 80 mM de MgCl₂ e então

ressuspenso em 2 mL de solução aquosa contendo 0,1 M de CaCl_2 . As células foram mantidas em banho de gelo a 0°C (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.6.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Alíquotas de 200 μL de células de *E. coli* DH5 α competentes (4.6.3) foram misturadas a 2 μL do sistema de ligação (4.6.2). Esta mistura foi resfriada em banho de gelo por 30 minutos e em seguida foi aquecida a 42°C em banho de água durante 90 segundos. Posteriormente, a mistura foi incubada novamente em banho de gelo por 1-2 minutos. Por fim foi acrescentado a essa mistura 800 μL de meio SOC e o sistema foi incubado durante 45 minutos a 37°C para recuperação. As células foram plaqueadas em meio sólido LA contendo antibiótico ampicilina (250 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosídeo) (30 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante a noite. As colônias contendo plasmídeos recombinantes (brancas) foram coletadas e organizadas em placas de petri de 96 amostras contendo meio sólido LA e ampicilina (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

4.6.5 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PLACAS DE 96 POÇOS

A purificação de DNA plasmidial foi feita em placas de 96 amostras pelo método de lise alcalina, de acordo com Faoro (2006), adaptado de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

4.6.6 SEQUENCIAMENTO DO GENE *SSU rRNA*

O sequenciamento do gene *SSU rRNA* foi realizado em placas de 96 poços utilizando dideoxinucleotídeos fluorescentes terminadores de cadeia (SANGER *et al.*, 1977). O sistema de reação foi constituído de aproximadamente 250 ng de DNA plasmidial fita dupla, 3,25 μL pmol de oligonucleotídeo iniciador (27F para *Bacteria* e

21F/958R para *Archaea*), 3 μL de reativo *ET terminador mix* (GE Health Care) e água ultrapura suficiente para 7,5 μL . A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador Eppendorf *Master Cycler Gradient* com as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos e 62°C por 2 minutos. A seguir o produto das reações foi purificado adicionando-se a cada poço 12,5 μL de água ultra pura, 2 μL de acetato de amônio 7,5 mol.L^{-1} e 3 volumes de etanol 96%. O DNA foi coletado por centrifugação a 4000 rpm por 45 minutos, lavado com 150 μL de etanol 70% e seco em estufa a 45°C. O DNA foi dissolvido em água e aplicado no sequenciador automático *MegaBACE 1000* (Amersham Life Science/Molecular Dynamics).

4.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DO GENE *SSU rRNA*

4.7.1 EDIÇÃO E GERAÇÃO DE SEQUÊNCIAS CONSENSO

As sequências geradas foram editadas para a remoção de bases de baixa qualidade usando o programa PHRED (EWING et al, 1998). Esse programa utiliza o cromatograma gerado pelo sequenciador automático para identificar a posição das bases e determinar a confiabilidade de cada nucleotídeo que compõe a sequência do DNA, revomendo as extremidades de baixa qualidade automaticamente.

Para as sequências do domínio *Archaea*, foram utilizados também os programas Phrap (www.phrap.com) e Consed (GORDON, et al., 1998). O programa Phrap alinhou as sequências obtidas com os oligonucleotídeos iniciadores 21F e 958R de cada clone, sobrepondo as regiões comuns das duas sequências, produzindo um fragmento final de aproximadamente 900 pb. Esse programa utilizou os valores de qualidade das bases fornecidos pelo programa Phred para a geração da sequência consenso. O programa Consed permitiu a visualização e confirmação da qualidade das sequências.

4.7.2 REMOÇÃO DAS SEQUÊNCIAS QUIMÉRICAS

Sequências quiméricas produzidas durante a PCR foram identificadas e removidas com os programas: Bellerophon usando a correção Huber–Hugenholtz (HUBER, FAULKNER e HUGENHOLTZ, 2004), Mallard (ASHELFORD et al., 2006) e/ou Pintail (ASHELFORD et al., 2005) usando como referência o banco do gene *SSU rRNA* do Greengenes para *Bacteria* (DE SANTIS et al., 2006) e o Silva para *Archaea* (PRUESSE et al., 2007).

O Pintail trabalha comparando distâncias evolutivas entre uma sequência alvo e uma sequência referência não quimérica, filogeneticamente próxima e escolhida pelo usuário. Na comparação utiliza uma janela de amostragem de tamanho específico e progride por números fixos de bases (l) ao longo das sequências, resultando em várias medições (m). A porcentagem das diferenças observadas revela o grau de variação entre as duas sequências ao longo do gene

SSU rRNA. O significado deste dado é aproximadamente equivalente à distância evolutiva não corrigida. Desta forma, a porcentagem das diferenças observadas (o_i) é comparada à porcentagem de diferenças que se esperaria de duas sequências confiáveis de distâncias evolutivas equivalentes (e_i), determinada a partir de um mapeamento preciso das regiões variáveis de 4383 sequências de estirpes conhecidas do RDP, utilizando como sequência referência o gene *SSU rRNA* da *E. coli* U00096. Quando a diferença observada é maior que a esperada é indicativo de que a sequência alvo apresenta alguma anomalia (ASHELFORD *et al.* 2005). A probabilidade da presença de sequências quiméricas é expressa através do valor de DE (do inglês, *deviation from expectation value*), calculado pela fórmula:

$$DE = \sqrt{\frac{\sum_1^m (o_i - e_i)^2}{m - 1}}$$

O programa Mallard é também baseado no algoritmo do Pintail, mas diferentemente deste programa o algoritmo é usado para todas as comparações par a par dentro de um alinhamento múltiplo de tamanho n , resultando em $(n^2-n)/2$ valores de DE, em que cada valor de DE representa uma única comparação par a par. Quanto maior o valor de DE, maior a probabilidade de que a sequência alvo ou a sequência referência (nesse caso, uma outra sequência da biblioteca) apresente alguma anomalia. Então plotando-se valores de DE, é possível identificar quais comparações par a par são mais prováveis de conter sequências anômalas, já que valores de DE gerados por sequências confiáveis tenderão a zero. O programa ainda utiliza valores de DE gerados a partir de uma coleção de 2007 sequências de estirpes conhecidas para gerar uma linha de corte utilizada para facilitar a identificação de possíveis sequências quiméricas. Valores de DE das sequências de uma biblioteca maiores que os valores de DE da linha de corte são um forte indicativo da presença de anomalias na sequência alvo ou na referência (ASHELFORD *et al.* 2006).

O Bellerophon detecta quimeras baseando-se em uma estratégia de comparação de árvores filogenéticas construídas com os fragmentos 5' (esquerda) e 3' (direita) das sequências do gene *SSU rRNA* alinhadas. Os padrões de ramificação dessas árvores são então utilizados para detectar incongruências que possam ser

indicativas de sequências quiméricas. Fragmentos derivados de sequências quiméricas terão localizações relativamente diferentes das demais sequências da biblioteca (HUBER, FAULKNER e HUGENHOLTZ, 2005).

4.8 SUBMISSÃO DAS SEQUÊNCIAS DO GENE *SSU rRNA* PARA O GENBANK

Após o cumprimento dos itens 4.7.1 e 4.7.2, as sequências do gene *SSU rRNA* foram depositadas no banco de dados do GenBank utilizando o programa *Sequin* (disponível no sítio: www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências submetidas encontram-se sob o número de acesso: HQ613951-HQ614492 para Domínio *Archaea* e HQ614493-HQ615057 para o Domínio *Bacteria*.

4.9 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E OBTENÇÃO DE MATRIZES DE DISTÂNCIA

As sequências foram alinhadas pelo programa Infernal, disponível no sítio do *RDPII* (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Esse programa utiliza modelos de probabilidade para gerar um alinhamento baseado nas estruturas secundárias do gene *SSU rRNA* (NAWROCKI e EDDY, 2009). O programa foi treinado com sequências inteiras do gene *SSU rRNA* de altíssima qualidade derivados principalmente de projetos de sequenciamento genômico. O modelo para o alinhamento das sequências do gene *SSU rRNA* usou 508 sequências para bactéria e 79 para arquea (COLE *et al.*, 2009).

Após o alinhamento, as sequências foram editadas manualmente e pelo programa Gblocks (CASTRESANA, 2000). Gblock é um programa que remove segmentos não conservados de um alinhamento para análises filogenéticas, eliminando regiões que acumulam muitas mutações, nas quais é impossível detectar um nucleotídeo ancestral. O modelo de substituição de nucleotídeo mais adequado foi escolhido pelos programas PAUP* (SWOFFORD, 2000) e Modeltest (POSADA e CRANDALL, 1998) e matrizes de distância foram geradas pelo PAUP*, usando os modelos de substituição mais adequados segundo o *Akaike Information Criterion* (POSADA e BUCKLEY, 2004).

4.10 COMPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE *BACTERIA* E *ARCHAEA*

A similaridade entre as bibliotecas foi examinada por diferentes métodos: Unifrac (LOZUPONE e KNIGHT., 2005), S-Libshuff (SCHLOSS *et al.*, 2004) e pela dissimilaridade de Bray-Curtis (LEGENDRE e LEGENDRE, 1998).

O programa S-Libshuff permite identificar se há diferenças biológicas entre as bibliotecas através de uma matriz de distância, usando a integral da estatística de Cramer von-Mises para calcular a distância entre as amostras e o teste de Monte Carlo para compará-las (SCHLOSS *et al.*, 2004). Para tanto, o programa cria uma curva de cobertura homóloga (C_X) para uma biblioteca (X) pela fórmula: $C_X = 1 - (N_X/n)$, onde N_X é o número de sequências únicas e n é o número total de sequências. N_X é definido para todos os níveis de similaridade entre as sequências ou distância evolutiva (D) e uma curva de cobertura homóloga é gerada usando os valores de C_X versus D. Essa curva de cobertura mostra como as sequências representam a biblioteca (X) para vários níveis de similaridade entre elas. Com a finalidade de comparar bibliotecas, o programa gera também uma curva de cobertura heteróloga entre a biblioteca X e biblioteca Y pela fórmula: $C_{XY} = 1 - (N_{XY}/n)$, onde N_{XY} é o número de sequências da biblioteca X não contidas na biblioteca Y e n é o número total de sequências da biblioteca X. Assim como N_X , N_{XY} pode também ser definida para diferentes níveis de similaridade entre as sequências para gerar uma curva de cobertura, C_{XY} versus D. Portanto, se a biblioteca X for igual a Y, é esperado que as curvas de cobertura $C_X(D)$ e $C_{XY}(D)$ sejam similares. Desta forma, um teste para diferenciar as curvas de cobertura é também um teste para diferenciar as bibliotecas X e Y. Para determinar se as curvas de cobertura são significativamente diferentes, a distância entre as duas curvas é inicialmente calculada usando a forma integrada do teste estatístico de Cramer von-Mises. Se a biblioteca $X = Y$, então a distância entre as duas curvas não deve ser significativamente diferente da distância calculada a partir de curvas geradas da seleção aleatória de sequências entre as bibliotecas X e Y. O programa, então, seleciona sequências aleatoriamente diversas vezes (N) e calcula a distância entre as curvas para cada aleatorização. Os valores resultantes da randomização mais o valor empírico da distância são organizados em ordem decrescente e um valor de P é estimado a partir da fórmula: $r/(N+1)$, onde r denota a ordem do valor empírico da

distância entre as bibliotecas. As duas bibliotecas são, portanto, consideradas significativamente diferentes quando o P for $< 0,05$. Entretanto, quando são feitas comparações múltiplas, deve ser aplicada a correção de Bonferroni. Essa correção minimiza a probabilidade de considerar incorretamente uma diferença como sendo significativa (ERRO TIPO I). Desta forma, o valor $p = 0,05$ deve ser dividido pelo número de comparações realizadas pelo programa ($P = 0,05/n^{\circ}_{\text{comparações}}$) e um novo valor de P é obtido para um teste utilizando mais de duas bibliotecas.

O Unifrac é um método utilizado para determinar diferenças entre comunidades microbianas baseadas na informação filogenética. A distância entre as comunidades é calculada aos pares. Todos os táxons descobertos em ambas as comunidades são posicionados em uma árvore filogenética. Ramos que levam para táxons das duas comunidades são marcados como “compartilhado” e ramos que levam para táxons que aparecem somente em uma são marcados como “não compartilhado”. A distância entre as duas amostras é então calculada como sendo: (a soma do comprimento dos ramos compartilhados)/(a soma dos ramos compartilhados e não compartilhados), ou seja, a fração do comprimento do ramo compartilhado. Após a obtenção das distâncias entre as amostras, uma matriz de distância é criada e métodos de agrupamento podem ser aplicados (LOZUPONE e KNIGHT, 2005).

A dissimilaridade de Bray-Curtis é um índice usado em ecologia para quantificar as dissimilaridades entre duas amostras. As dissimilaridades são calculadas a partir do número total de espécies que são únicos para qualquer uma das duas amostras divididos pelo número total de espécies das duas bibliotecas analisadas. O índice de dissimilaridade de Bray-Curtis varia de 0 a 1, em que 0 significa que as duas amostras têm a mesma composição (compartilham todas as espécies) e o valor 1 significa que não há espécies em comum (não compartilham nenhuma espécie) (LEGENDRE e LEGENDRE, 1998). Essa análise foi realizada no programa R (KINDT e COE, 2005), usando uma matriz de abundância OTU_{0.03} (do inglês, *Operational Taxonomic Units*, correspondendo a um agrupamento de sequências com identidade $\geq 97\%$).

4.11 DISTRIBUIÇÃO DAS OTU_{0.03} ENTRE AS BIBLIOTECAS

As OTU_{0.03} compartilhadas entre as bibliotecas foram identificadas através do diagrama de Venn gerado pelo programa Mothur (SCHLOSS *et al.*, 2009).

4.12 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS SEQUÊNCIAS DO GENE *SSU rRNA*

A identificação taxonômica das sequências do gene *SSU rRNA* do Domínio *Bacteria* foi feita através do banco de dados de genes ribossomais do RDPII (do inglês, *Ribosomal Database Project II*, disponível no sítio: <http://rdp.cme.msu.edu>), atualizado em 31/03/2010 – contendo 1.396.793 sequências do gene *SSU rRNA*. A classificação taxonômica do RDPII é baseada na proposta de Garrity e colaboradores (2007), com reorganizações adicionais para *Firmicutes* (LUDWIG *et al.*, 2008), *Cyanobacteria* (WILMOTTE e HERDMAN, 2001) e com classificações de novas linhagens já bem definidas de filo com poucos cultivares de *Acidobacteria* (BARNS *et al.*, 2007), *Verrucomicrobia* (SANGWAN *et al.*, 2004) e *OP11* (HARRIS *et al.*, 2004).

As sequências do Domínio *Archaea* foram comparadas com 2.297 sequências do gene *SSU rRNA* de arquea presentes no banco de dados Silva (PRUESSE *et al.*, 2007, disponível no sítio: <http://www.arb-silva.de/>). Todas as sequências desse banco de dados carregam a classificação taxonômica adotada por ENA-EBI-EMBL (do inglês, *European Nucleotide Archive*, *European Bioinformatics Institute* e *European Molecular Biology Laboratory*, respectivamente). Sempre que possível, as classificações taxonômicas adotadas pelo RDPII e pelo Greengenes (DESANTIS *et al.*, 2006; disponível no sítio: <http://greengenes.lbl.gov/>) são comparadas com o banco de dados Silva para avaliação (PRUESSE *et al.*, 2007).

4.13 INDÍCES ECOLÓGICOS

A riqueza das OTU_{0.03} foi avaliada através de curvas de rarefação, uma vez que esta metodologia tem sido considerada uma solução para os índices de diversidade dependentes do tamanho da amostra (HUGHES *et al.*, 2001).

Perfis de diversidade de Renyi foram construídos para ordenar as comunidades procarióticas com base em sua diversidade, no programa R (KINDT e COE, 2005). A ordenação baseada nesse perfil que calcula conjuntamente os índices de Shannon, recíproca de Simpson e de Berger-Parker é mais segura do que o ordenamento baseado em índices únicos, uma vez que, nesse último, a ordem pode mudar quando esses diferentes índices são usados separadamente (KINDT e COE, 2005).

4.14 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Filogenias foram construídas com o algoritmo *neighbor-joining*, através do programa MEGA version 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007). O modelo de substituição de nucleotídeo mais adequado foi escolhido pelos programas PAUP* (SWOFFORD, 2000) e Modeltest (POSADA e CRANDALL, 1998).

5.0 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS COMUNIDADES PROCARIÓTICAS E DO SOLO

Os solos dos Campos de Altitude paranaenses apresentaram uma acidez muito elevada ($< 4,50$ em CaCl_2) e um horizonte H hístico (caracterizado por apresentar teor de matéria orgânica ≥ 80 g/kg de solo), classificando-se como organossolo (TABELA 4) (EMBRAPA, 1999). Das três unidades fitogeográficas analisadas a Serra do Mar foi a que apresentou solo com o menor pH (3,20) e os Campos Gerais o maior conteúdo de matéria orgânica (TABELA 4).

TABELA 4 - VALORES DE pH E CONTEÚDO DE MATÉRIA ORGÂNICA DOS ORGANOSSOLOS DAS TURFEIRAS

Organossolo (Amostra)	Posição Fisiográfica	Profundidade	pH (CaCl_2)	Matéria Orgânica (g/kg)
Serra do Mar (SM20)	Serra do Mar	20 cm	3,20	441,54
Campos Gerais (CG20)	Segundo Planalto	20 cm	3,80	460,10
Campos Gerais (CG50)	Segundo Planalto	50 cm	3,80	458,50
Palmas (PA20)	Terceiro Planalto	20 cm	4,00	297,51

Para investigar se as comunidades bacterianas estão homogeneamente distribuídas nessas áreas, 8 amostras simples de organossolos coletadas a 20 cm de profundidade nos Campos Gerais (CG20) foram usadas para uma análise comparativa das comunidades por ARDRA (FIGURA 4a). A análise dos perfis de restrição do gene *SSU rRNA* separou as comunidades bacterianas em dois grandes grupos. As quatro comunidades que se encontravam a uma distância inferior a 3 metros umas das outras foram mais similares entre si (FIGURA 4a). Este resultado confirmou a heterogeneidade das comunidades bacterianas dos organossolos e direcionou o desenvolvimento desse trabalho mostrando a necessidade de se trabalhar com amostras compostas de organossolos para melhor representar a diversidade microbiana presente nessas turfeiras.

Para obter as amostras compostas de cada área amostrada, 10 amostras simples das 25 coletadas foram aleatoriamente selecionadas e misturadas. A reprodutibilidade e a representatividade desta metodologia puderam ser testadas ao comparar os perfis de ARDRA em triplicatas. Na FIGURA 4b, é mostrado que as três amostras geradas por diferentes combinações de 10 das 25 amostras simples de SM20 (as triplicatas SM20) tiveram o mesmo perfil de restrição. A alta similaridade entre as triplicatas foi também observada quando as amostras compostas CG20 e CG50 foram analisadas. Por outro lado, perfis de restrição diferentes foram vistos entre SM20, CG20 e CG50. Esses resultados indicaram que a metodologia de geração das amostras compostas além de ser reprodutível foi também sensível para detectar diferenças entre as amostras coletadas em áreas distintas. Desta forma, para determinar a diversidade, identificar os táxons e a sua distribuição, bibliotecas do gene *SSU rRNA* foram construídas e sequenciadas utilizando-se essas mesmas amostras compostas.

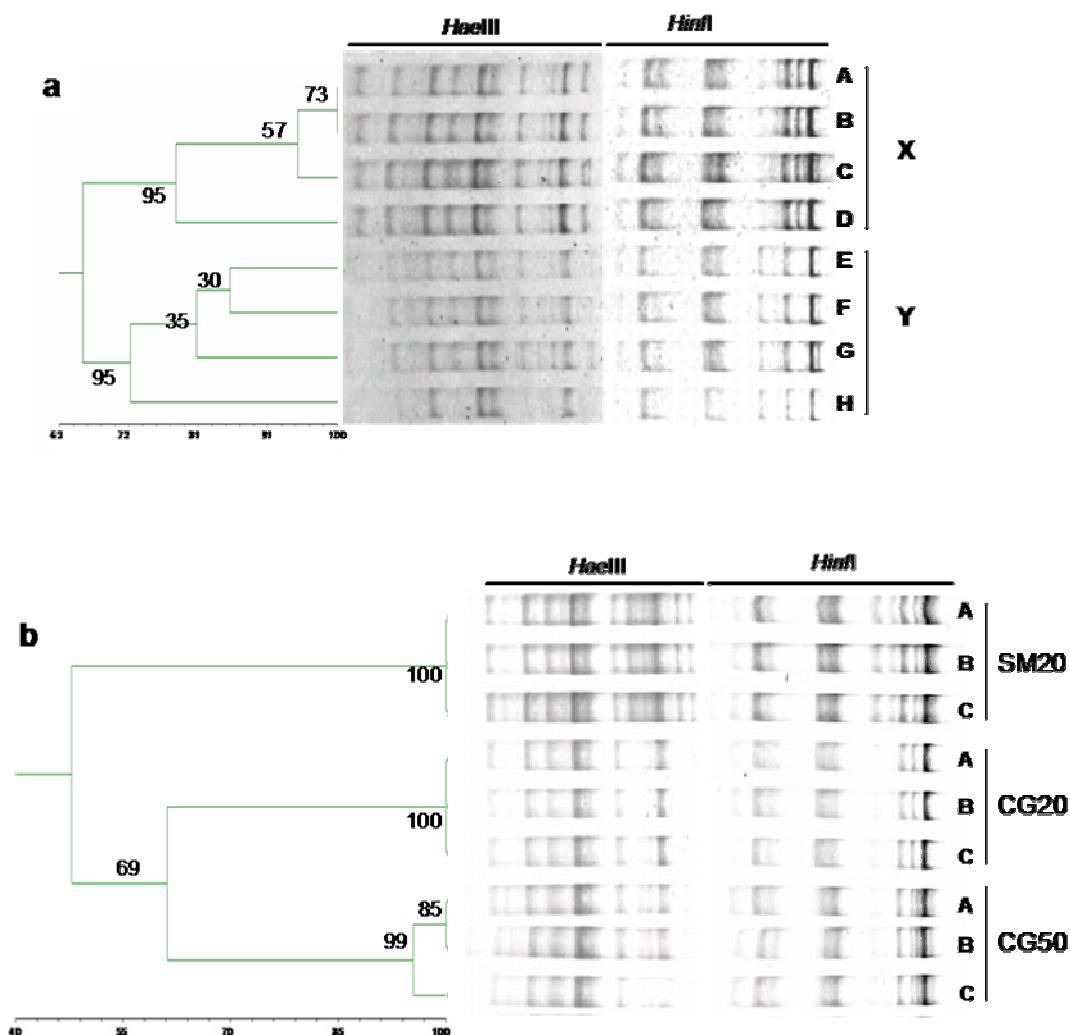


FIGURA 4 - COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES AMOSTRAGENS DE ORGANOSSOLO POR ARDRA. As análises dos perfis de ARDRA foram realizadas conforme descrito na seção 4.5. (a) Comparação dos perfis de restrição de 8 amostras simples de organossolos dos Campos Gerais coletados a 20 cm de profundidade (A a D - distância entre as amostras inferior a 3 metros; E a H - distância entre as amostras inferior a 3 metros; X e Y - distância entre as amostras superior a 15 metros). (b) Comparação dos perfis gerados pelas enzimas de restrição *HaeIII* e *HinfI* de 9 amostras compostas de organossolo de três áreas: SM20 (Serra do Mar, 20 cm de profundidade), CG20 e CG50 (Campos Gerais, 20 cm e 50 cm de profundidade, respectivamente). A, B, C representam triplicatas de cada área. Os dendogramas de similaridade foram gerados pelo NTSys pc 2.1 (Applied Biostatistics Inc), utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e o algoritmo UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*). Valores de *bootstrap* estão representados nos dendogramas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS DAS TURFEIRAS DOS CAMPOS DE ALTITUDE PARANAENSES

5.2.1 SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NÃO QUIMÉRICAS DO GENE *SSU rRNA* DE BACTÉRIA

O DNA total das amostras compostas dos organossolos coletados a 20 cm de profundidade na Serra do Mar (SM20) e em Palmas (PA20) e o DNA total das amostras coletados a 20 cm e a 50 cm de profundidade nos Campos Gerais (CG20 e CG50, respectivamente) foram utilizados para a construção de bibliotecas do gene *SSU rRNA* bacteriano em *E. coli* DH5 α (item 4.6). Ao total foram obtidos 960 clones (SM20 = 192, CG20 = 192, CG50 = 192 e PA20 = 384). Após a extração do DNA plasmidial, sequenciamento do gene *SSU rRNA* (item 4.6.5 e 4.6.6) e a retirada de regiões contendo bases de baixa qualidade utilizando o programa Phred (item 4.7.1), 715 sequências de nucleotídeos (*reads*) foram obtidas.

Estima-se que 30% das sequências presentes em bibliotecas obtidas pelo método de Sanger sejam quimeras oriundas do reanelamento de *amplicons* prematuros ou da degradação do DNA molde (PAABO, IRWIN e WILSON., 1990; KOPCZYNSKI, BATESON e WARD, 1994; WANG e WANG, 1996; WANG e WANG, 1997; RAPPE e GIOVANNONI, 2003). Dessa forma, para evitar que sequências quiméricas do gene *SSU rRNA* gerassem falsas impressões da diversidade ambiental e comprometessem as análises filogenéticas, as quimeras foram retiradas pelos programas Mallard e Pintail (ASHELFORD *et al.*, 2005, 2006), usando como referência o banco de alinhamento de sequências do Greengenes (DESANTIS *et al.*, 2006). Ao final dessa triagem, 565 sequências do gene *SSU rRNA* livre de quimeras foram selecionadas (SM20 = 114, CG20 = 98, CG50 = 94 e PA20 = 259 sequências), alinhadas e utilizadas para geração de matrizes de distância.

5.2.2 ANÁLISE DE COBERTURA DOS DIFERENTES NÍVEIS TAXONÔMICOS BACTERIANOS

Para calcular a cobertura dos diferentes níveis taxonômicos foi necessário obter uma matriz de distância das sequências alinhadas. Para se construir uma matriz de distância confiável, as sequências não podem ser muito similares a ponto de se tornar desprovidas de informações filogenéticas, nem muito divergentes, caso em que as posições dos nucleotídeos podem ser saturadas por múltiplas substituições (GOLDMAN, 1998; YANG, 1998). Já que nem todas as regiões de um gene evoluem na mesma frequência, algumas partes de um alinhamento são conservadas e, portanto, apropriadas para análises filogenéticas, enquanto outras são muito divergentes impedindo a determinação de uma posição homóloga e ocultando informação filogenética a partir de modelos de substituições múltiplos. Em alguns casos é recomendado que regiões divergentes sejam removidas antes das análises filogenéticas (LAKE, 1991; OLSEN e WOESE, 1993; HILLIS *et al.*, 1996). Como isso é usualmente feito de modo arbitrário, os resultados ficam difíceis de reproduzir. Além disso, tem sido mostrado que a estratégia de alinhamento tem um impacto maior na reconstrução da árvore filogenética do que no tipo de método usado para construir a matriz de distância (MORRISON e ELLIS, 1997), reforçando a importância de um eficiente alinhamento das sequências em filogenética molecular.

Para satisfazer as necessidades de uma análise filogenética acurada, as sequências de nucleotídeos das bibliotecas foram alinhadas pelo programa Infernal contendo informações da estrutura secundária do gene *SSU rRNA* de 508 bactérias e 79 arqueas (item 4.9).

Visando à reprodutibilidade das análises, a edição do alinhamento das sequências foi realizada pelo programa GBlocks (item 4.9), gerando sequências de tamanho médio de 450 pares de bases, compreendendo as regiões V2-V3 do gene *SSU rRNA*. A figura 5 mostra os histogramas dos comprimentos/posições das sequências de nucleotídeos selecionadas para cada biblioteca.

Além da necessidade de que bons alinhamentos e edições para uma análise precisa e reprodutível sejam feitos, é descrito que o uso de diferentes modelos de substituição de nucleotídeos afeta a inferência filogenética (CASTRESANA, 2000). Por exemplo, estimativas de filogenias, taxa de substituição, valores de *bootstrap* e

determinação do relógio molecular são claramente influenciados pelo modelo evolutivo empregado (BUCKLEY, 2002; BUCKLEY e CUNNINGHAM, 2002; BUCKLEY *et al.*, 2001; KELSEY *et al.*, 1999; PUPKO *et al.*, 2002; SUZUKI *et al.*, 2002; TAMURA, 1994; ZHANG, 1999). Desta forma, matrizes de distâncias genéticas das sequências do gene *SSU rRNA* bacteriano foram então calculadas usando os modelos de substituição mais adequados para cada biblioteca segundo o *Akaike Information Criterion* (item 4.9) (TABELA 5).

Através das matrizes, as sequências do gene *SSU rRNA* foram agrupadas em OTU's (do inglês, *Operational Taxonomic Units*) pelo critério baseado na distância genética, através do programa Mothur (SCHLOSS *et al.*, 2009), e curvas de rarefação para distâncias genéticas referentes às espécies, aos gêneros, às classes e aos filos foram geradas (FIGURA 6 e 7).

Os perfis das curvas de rarefação (FIGURA 6 e 7) mostram uma alta riqueza de OTU's nos diferentes níveis taxonômicos presentes nesses organossolos. As curvas indicam uma maior riqueza de gêneros e espécies para as amostras coletadas a 20cm de profundidade do solo (SM20, CG20 e PA20). As amostras SM20 e PA20 apresentaram maior número de OTU's com 0,15% e 0,2% de dissimilaridade, portanto com maior riqueza de classes e filos, respectivamente. As amostras coletadas na mesma área, diferindo somente na profundidade da amostragem (CG20 e CG50), apresentaram riquezas de classes e filos mais próximas. Entretanto similaridades nas riquezas de OTU's não significam que as comunidades tenham a mesma composição filogenética.

TABELA 5 - MODELOS DE SUBSTITUIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS USADOS PARA GERAR A MATRIZ DE DISTÂNCIA GENÉTICA BACTÉRIANA

Biblioteca	Nº de sequências	Modelos-AIC	G	I
SM20	114	GTR	0,7862	0,1906
CG20	98	GTR	0,7465	0,1569
CG50	94	GTR	0,7851	0,2537
PA20	259	GTR	0,6928	0,1086
Bacteria	565	GTR	0,7136	0,0605

NOTA: AIC = *Akaike Information Criterion*; GTR = *General Time Reversible* (WADDELL e STEEL, 1997). G = fator de correção gamma para sítios variáveis; I = Proporção de sítios invariáveis; Bacteria: biblioteca contendo as sequências SM20, CG20, CG50 e PA20.

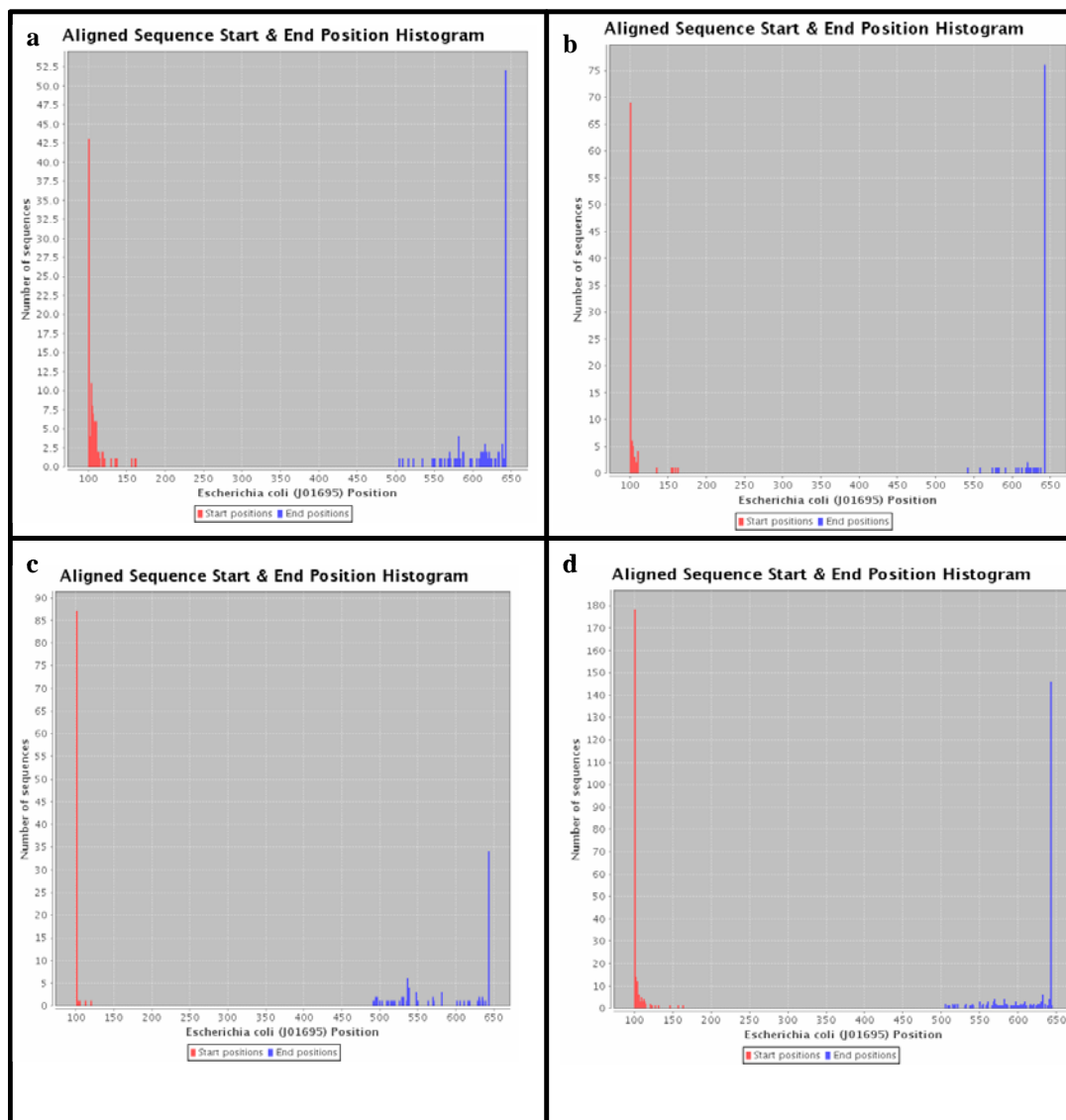


FIGURA 5 – HISTOGRAMA DAS SEQUÊNCIAS DO GENE *SSU rRNA* DE *BACTERIA*. Histograma das sequências não quiméricas do gene *SSU rRNA* alinhadas com o programa Infernal (NAWROCKI e EDDY, 2009). Na ordenada está representado o número de sequências e na abscissa a posição dos nucleotídeos do gene *SSU rRNA* de *E. coli* (JO1695) como referência. Em vermelho é mostrado a posição do primeiro e em azul a do último nucleotídeo das sequências analisadas. As sequências hipervariáveis de V1 a V9 ocupam as regiões entre os nucleotídeos 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 e 1435-1465, respectivamente. As bibliotecas estão representadas por letras minúsculas: (a). SM20, (b). CG20, (c). CG50 e (d). PA20.

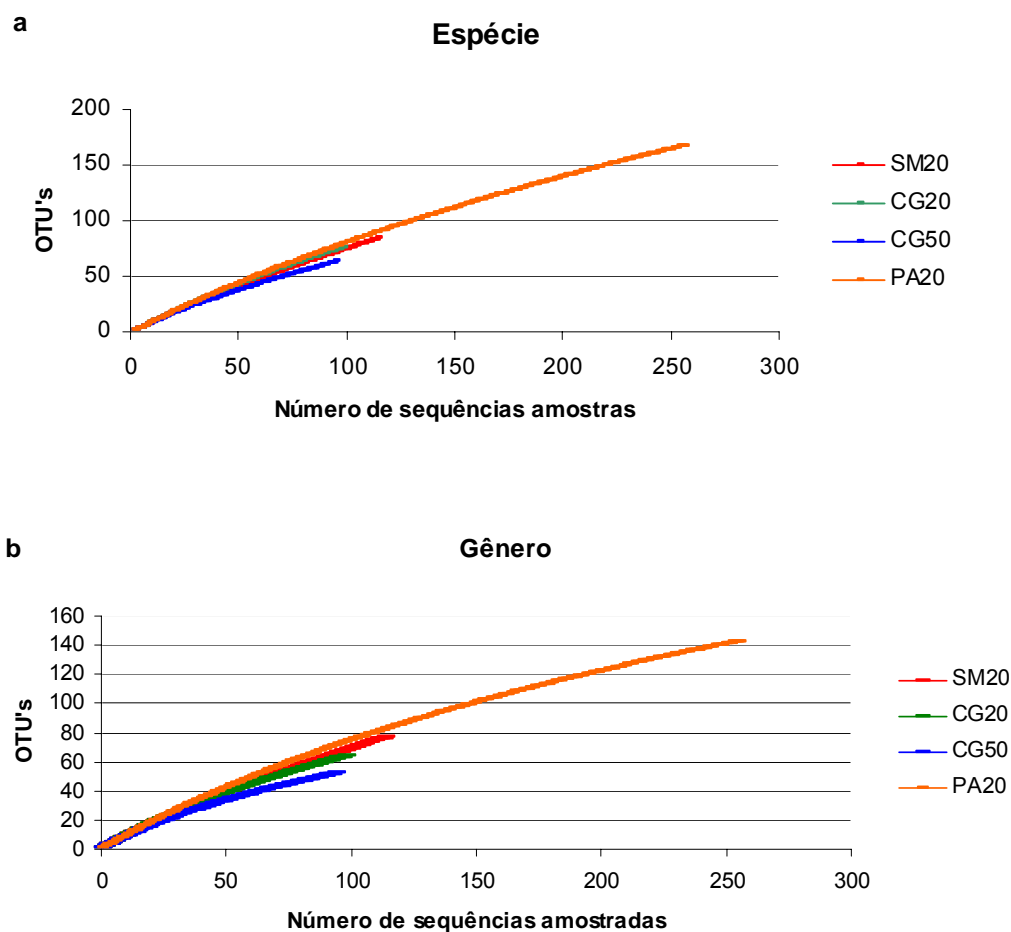


FIGURA 6 – CURVAS DE RAREFAÇÃO DE ESPÉCIES E GÊNEROS BACTERIANOS. Curvas de rarefação das bibliotecas do gene *SSU rRNA* bacteriano. Sequências que apresentaram uma identidade maior que 97% e 95% foram agrupadas em OTU's como sendo da mesma espécie (a) e gênero (b), respectivamente (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005; 2006).

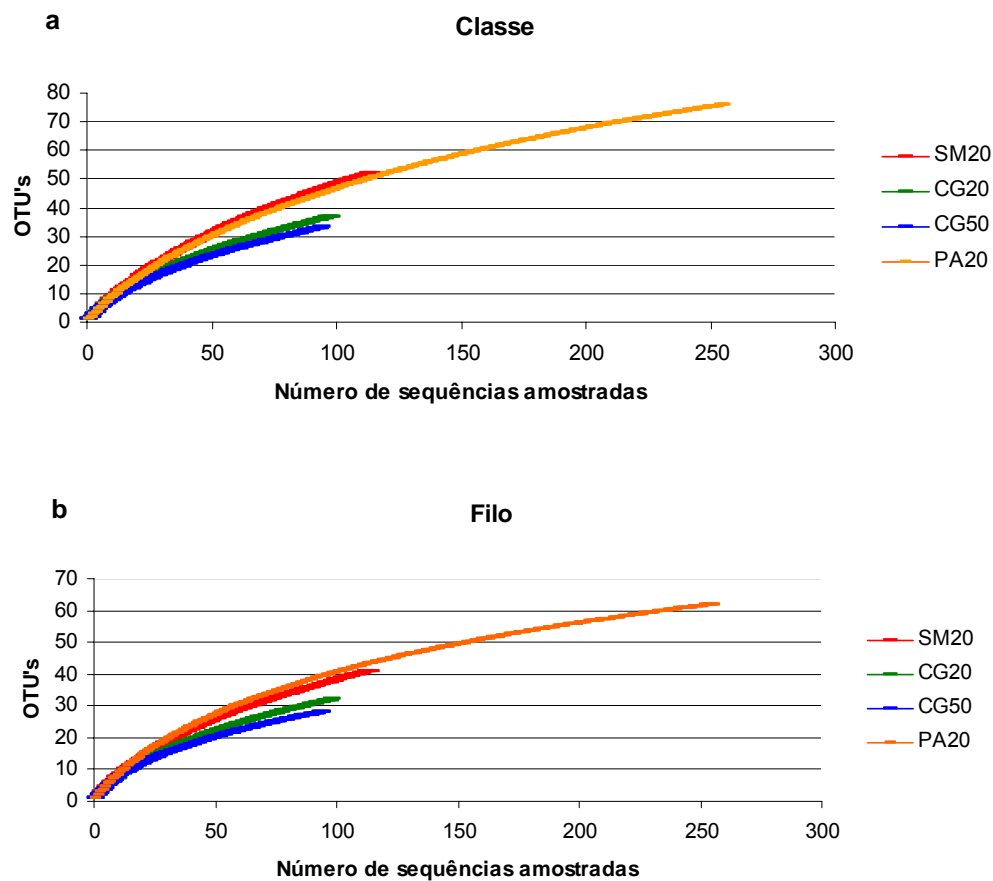


FIGURA 7 – CURVAS DE RAREFAÇÃO DE CLASSES E FILOS BACTERIANOS. Curvas de rarefação das bibliotecas do gene *SSU rRNA* bacteriano. Sequências que apresentaram uma identidade maior que 85% e 80% foram agrupadas em OTU's como sendo da mesma classe (a) e filo (b), respectivamente (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005; 2006).

5.2.3 COMPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DO GENE SSU *rRNA* BACTERIANO

5.2.3.1 Comparação das comunidades pelo programa J-Libshuff

As bibliotecas foram comparadas pelo programa J-Libshuff e os valores de P dessa análise estão representados na tabela 6. Para essa análise o número de sequências da biblioteca PA20 (259 sequências) foi normalizado de forma aleatória para apresentar uma quantidade de sequências próximas das demais bibliotecas. Sendo utilizadas, então, 100 sequências para a biblioteca PA20. As demais bibliotecas mantiveram as quantidades de sequências originais nessa análise.

Apenas as bibliotecas CG20 e CG50 não foram significativamente diferentes entre si nas duas comparações, mostrando valores de $P > 0,0042$ (Valor de P calculado após a correção de Bonferroni, $P = 0,05/12$ número de comparações).

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DO GENE *SSU rRNA* DE *BACTERIA* PELO PROGRAMA J-LIBSHUFF.

Comparação	Valor de <i>P</i>
CG20-CG50	0,3417
CG50-CG20	0,0348
CG20-PA20	0,0005
PA20-CG20	<0,0001
CG20-SM20	0,0002
SM20-CG20	<0,0001
CG50-PA20	0,001
PA20-CG50	0,0006
CG50-SM20	<0,0001
SM20-CG50	<0,0001
PA20-SM20	<0,0001
SM20-PA20	<0,0001

NOTA: Bibliotecas que tiveram valores de $P > 0,0042$ nas duas comparações par a par são consideradas como similares e que tiveram valores de $P < 0,0042$ são consideradas diferentes.

5.2.3.2 Comparação das comunidades por agrupamento

Duas abordagens diferentes de agrupamento foram utilizadas para calcular a proximidade das bibliotecas. Na primeira, o programa Unifrac foi usado com o método de amostragem Jackknife, impedindo que diferenças no número de sequências presentes nas bibliotecas afetasse os resultados de agrupamento (FIGURA 8a). Na segunda abordagem, as espécies de cada amostra foram comparadas pelo programa R (KINDT e COE, 2005), usando uma matriz de OTU_{0.03} e a distância de Bray-Curtis (FIGURA 8b).

As figuras 8A e 8B mostram que as comunidades bacterianas do Segundo Planalto (CG20 e CG50) e do Terceiro Planalto (PA20) são mais similares e que ocorrem menos variações na composição bacteriana em diferentes profundidades (CG20 e CG50) do que em diferentes áreas amostradas (CG20, PA20 e SM20). No entanto essas análises não permitem identificar os táxons responsáveis pelas diferenças na composição das comunidades bacterianas.

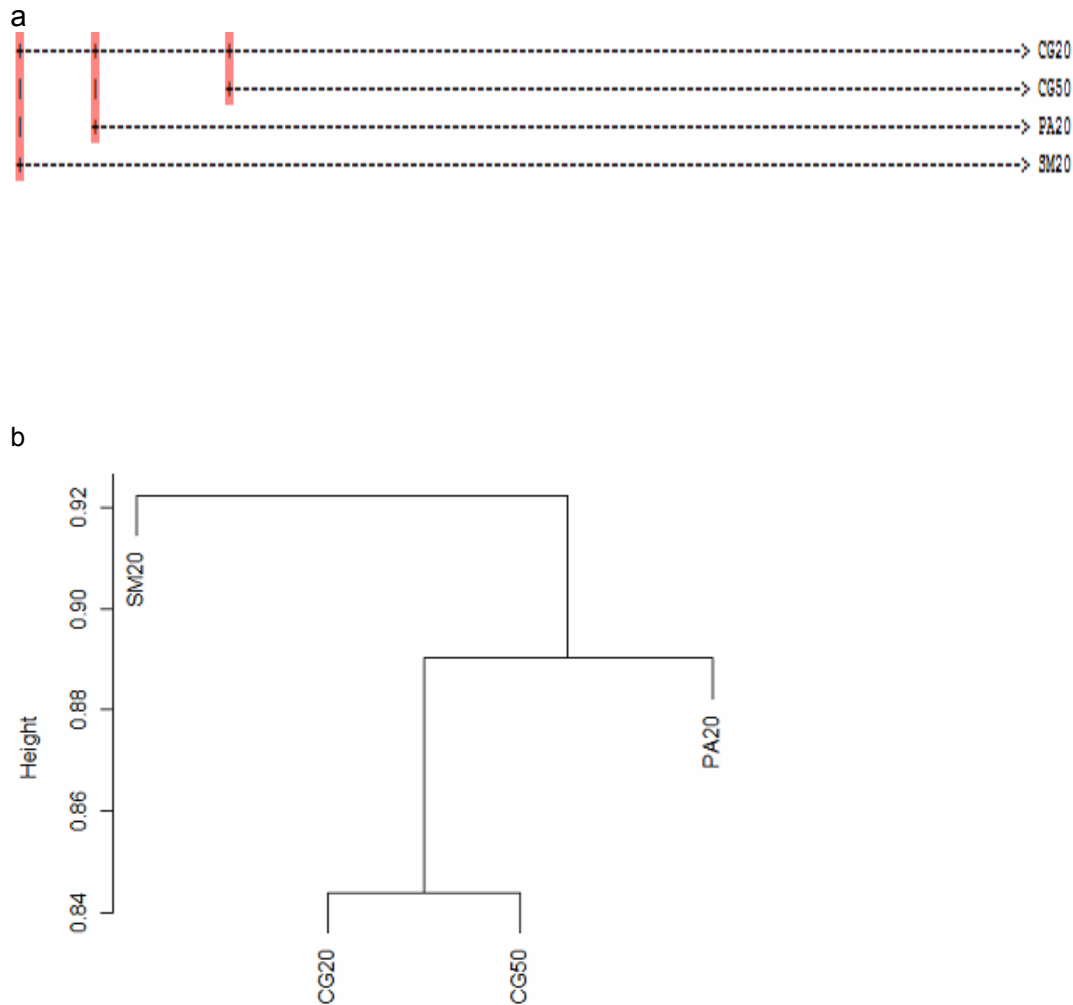


FIGURA 8 – AGRUPAMENTO DAS BIBLIOTECAS DO GENE *SSU rRNA* DE *BACTERIA*. Dendogramas obtidos com o algoritmo UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*). (a) Dendograma gerado pelo programa Unifrac usando a estatística de amostragem Jackknife, com número de sequências corrigido para 94 e com 100 permutações. A cor vermelha representa a posição do nó em >99,9% das permutações. Escala: 1 traço representa 0,0036 unidades do comprimento do ramo. (b) Dendograma gerado pelo programa R, baseado nos valores de dissimilaridade de Bray-Curtis entre as OTU_{0.03} das comunidades bacterianas. Os resultados foram obtidos depois de 100 permutações dos dados.

5.2.4 CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS TÁXONS BACTERIANOS

Métodos estatísticos usados pelos programas J-Libshuff, Unifrac e dendogramas de dissimilaridade, apesar de compararem comunidades, não permitem uma análise de distribuição de táxons (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2006). Para determinar a distribuição das espécies (OTU_{0.03}) nas bibliotecas, foi utilizado o programa Mothur, que agrupa as sequências em OTU's para estimar a sobreposição dos membros em diferentes comunidades, possibilitando a identificação de espécies compartilhadas entre as bibliotecas (FIGURA 9).

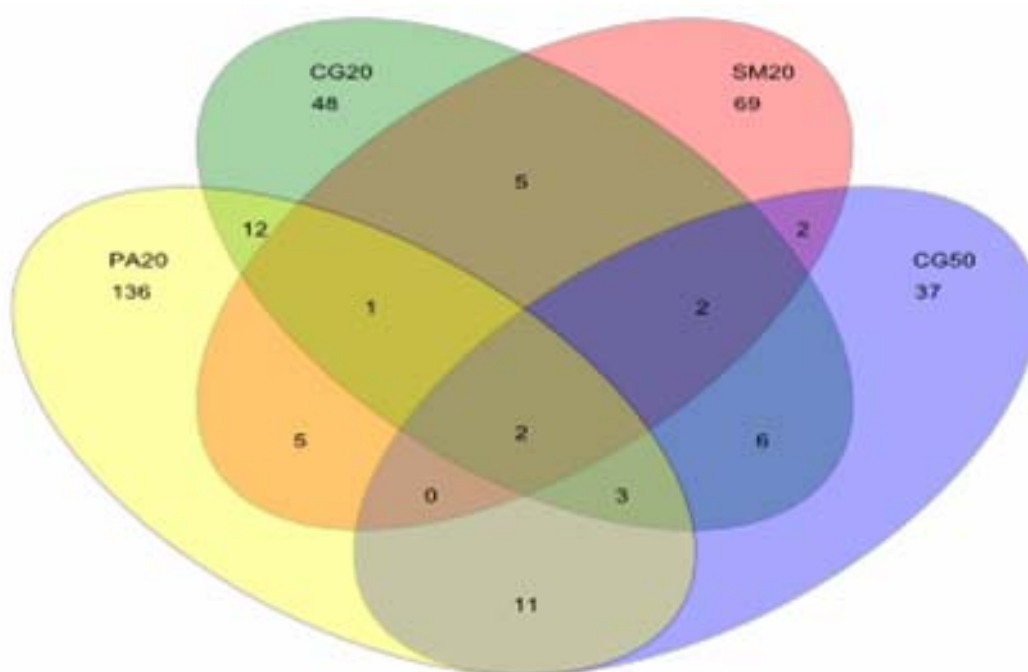
A comparação das 565 sequências não quiméricas do gene *SSU rRNA* com o banco do RDP indicou a predominância dos filos *Acidobacteria* (38,8%) e *Proteobacteria* (27,4%) (FIGURA 10). Aproximadamente 71% dos representantes do filo *Acidobacteria* pertenceram ao gênero *Gp1* ou *Gp2* (FIGURA 11). Representantes da classe α (16,1%), β (14,2%), γ (8,4%), δ (56,8%) *Proteobacteria* foram encontrados (FIGURA 12). Os demais grupos encontrados foram: *Bacteria_incertae_sedis* (5,1%); *Chloroflexi* (4,8%); *Firmicutes* (4,2%); *Bacteroidetes* (3,4%); *Verrucomicrobia* (2,7%); *Nitrospira* (1,6%); *Actinobacteria* (1,4%); *Planctomycetes* (0,4%); *WS3*, *Fibrobacteres*, *OP10*, *Spirochaetes* e *Gemmatimonadetes* (0,2%). Aproximadamente 14% das sequências apresentaram menos que 80% de similaridade com as sequências do banco do RDP e, portanto, não foram classificadas ao nível de filo (FIGURA 10).

A análise de distribuição das espécies, representado no diagrama de Venn, mostra um elevado grau de OTU's bacterianas não compartilhadas nas bibliotecas, SM20 e PA20 com 80%, CG20 61% e CG50 59% das OTU_{0.03} (FIGURA 9). Observa-se que táxons da classe δ -*proteobacteria* e dos gêneros *Gp1* e *Gp2*, estiveram presentes em todas as comparações par a par. Esses dois gêneros de *Acidobacteria* representaram as 2 OTU_{0.03} compartilhadas por todas as bibliotecas (FIGURA 9 e TABELA 7).

Análises filogenéticas dos grupos dominantes mostraram que os gêneros de *Acidobacteria* (com exceção do gênero *Gp13*, que não apresentou membros em SM20) e as classes α -, β -, γ - e δ -*proteobacteria* apresentaram táxons bem distribuídos entre as amostras, apresentando poucos agrupamentos de sequências

filogeneticamente próximas dentro de uma mesma biblioteca (FIGURA 11 e 12). Os filos responsáveis pelas diferenças entre as bibliotecas foram *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteria_incertainae_sedis*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* e *Actinobacteria* (FIGURA 10).

Estes resultados mostram, portanto, que os táxons dominantes são os responsáveis pelas similaridades das comunidades, enquanto as espécies pertencentes aos filos de menor ocorrência são as responsáveis pelas diferenças observadas.



Biblioteca (Turfeira - profundidade)	Posição Fisiográfica	OTU _{0.03}	
		Não compartilhadas	Compartilhada
SM20 (Serra do Mar – 20 cm)	Serra do Mar	69 (80,2%)	17 (19,8%)
CG20 (Campos Gerais – 20 cm)	Segundo Planalto	48 (60,7%)	31 (39,3%)
CG50 (Campos Gerais – 50 cm)	Segundo Planalto	37 (58,7%)	26 (41,3%)
PA20 (Palmas – 20 cm)	Terceiro Planalto	136 (80%)	34 (20%)

FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DAS OTU_{0.03} DE *BACTERIA*. Diagrama de Venn comparando as OTU_{0.03} presentes nas bibliotecas SM20, CG20, CG50 e PA20. Abaixo é mostrada a porcentagem de OTU_{0.03} compartilhada e não compartilhada entre as bibliotecas.

TABELA 7 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS OTU_{0.03} DE BACTERIA COMPARTILHADAS ENTRE AS BIBLIOTECAS

Bibliotecas	OTU _{0.03} compartilhadas	Sequências	Classificação taxonômica mais profunda
SM20 CG20	10	45	<i>Gp1</i> (3), <i>Gp2</i> (4), <i>Gammaproteobacteria</i> (1), <i>Deltaproteobacteria</i> (1), <i>Proteobacteria</i> (3) e <i>Bacteria</i> (1).
SM20 CG50	6	27	<i>Gp3</i> (1), <i>Gp2</i> (2), <i>Gp1</i> (2) e <i>Deltaproteobacteria</i> (1).
SM20 PA20	8	27	<i>Deltaproteobacteria</i> (1), <i>Gp3</i> (1), <i>Gp2</i> (2), <i>Gp1</i> (2) e <i>Bacteria</i> (2).
CG20 CG50	13	50	<i>Ktedonobacter</i> (1), <i>Betaproteobacteria</i> (1), <i>Deltaproteobacteria</i> (2), <i>Gp13</i> (1), <i>Gp1</i> (3), <i>Gp2</i> (4) e <i>Bacteria</i> (1).
CG20 PA20	18	47	<i>Anaerolineales</i> (1), <i>Nitrospira</i> (1), <i>Gp3</i> (1), <i>Gp2</i> (2), <i>Gp1</i> (4), <i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i> (1), <i>Betaproteobacteria</i> (1), <i>Deltaproteobacteria</i> (2), <i>Proteobacteria</i> (2) e <i>Bacteria</i> (3).
PA20 CG50	16	64	<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i> (1), <i>Ktedonobacter</i> (1), <i>Desulfuromonadales</i> (1), <i>Deltaproteobacteria</i> (1), <i>Gp3</i> (1), <i>Gp13</i> (1), <i>Gp1</i> (3), <i>Gp2</i> (5) e <i>Bacteria</i> (2).
SM20 CG20 CG50	4	31	<i>Gp2</i> (2), <i>Gp1</i> (1) e <i>Deltaproteobacteria</i> (1).
SM20 CG20 PA20	3	23	<i>Proteobacteria</i> (1), <i>Gp2</i> (1) e <i>Gp1</i> (1)
SM20 CG50 PA20	2	24	<i>Gp2</i> (1) e <i>Gp1</i> (1).
CG20 CG50 PA20	5	34	<i>Deltaproteobacteria</i> (1), <i>Gp2</i> (2) e <i>Gp1</i> (2).
SM20 CG20 CG50 PA20	2	29	<i>Gp2</i> (1) e <i>Gp1</i> (1).

NOTA: Valores entre parênteses correspondem ao número de OTU_{0.03} para um determinado táxon; os táxons foram selecionados utilizando um *cutoff* de 80% no *RDPII*, utilizando o programa Classifier (disponível no sítio: <http://www.rdp.cme.msu.edu/classifier/>)

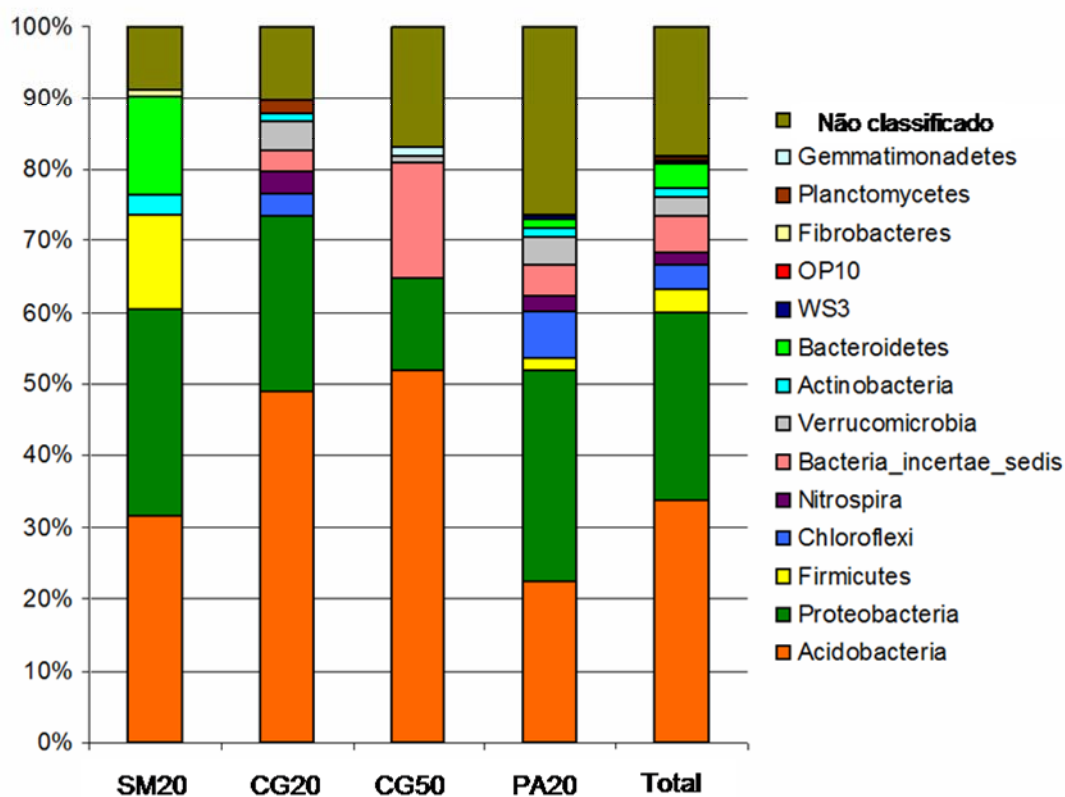


FIGURA 10 - PORCENTAGEM DE DISTRIBUIÇÃO DE FILOS BACTERIANOS. Sequências do gene *SSU rRNA* foram comparadas com o banco de dados do *RDP II* para a identificação dos filos bacterianos, usando a ferramenta Classifier (disponível no sítio: <http://www.rdp.cme.msu.edu/classifier/>) e um *cutoff* de 80%. Total: biblioteca contendo as sequências SM20, CG20, CG50 e PA20.

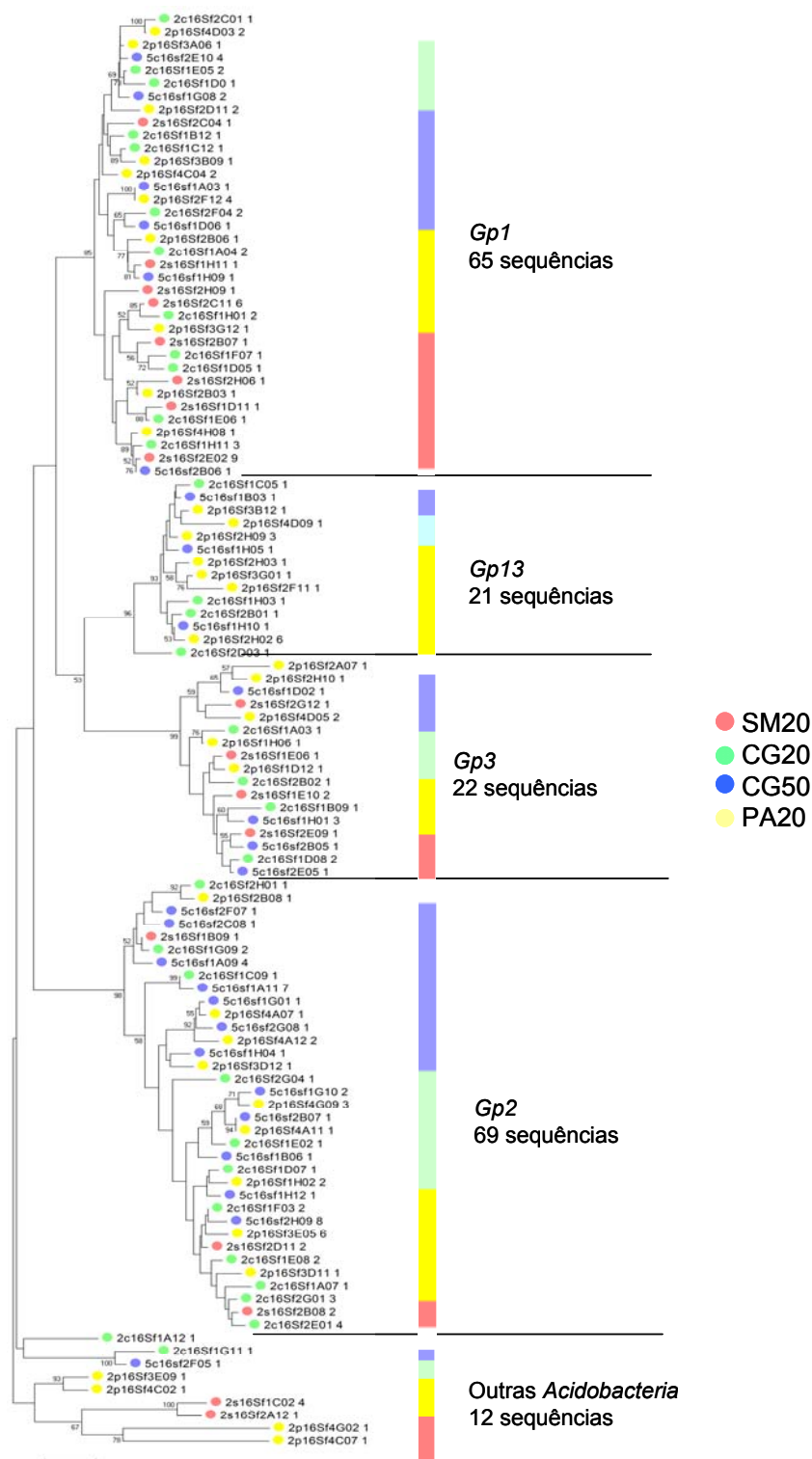


FIGURA 11– ARVORE FILOGENÉTICA DE *ACIDOBACTERIA*. elações filogenéticas das OTU_{0.03} de *Acidobacteria* e suas áreas de origem. Cada círculo representa uma diferente OTU_{0.03} e o identificador dos clones usados como representativos para a OTU está indicado, seguido do número de clones para a OTU. Cada biblioteca é indicada por uma cor diferente, como mostrado à direita da figura. A barra indica a proporção de sequências dentro de cada gênero. Filogenias foram estimadas por *neighbor joining*, usando o modelo de substituição Tamura Nei e correção gamma ($\gamma = 0,4882$). A árvore não está enraizada. A barra de escala representa o número de substituições por nucleotídeo, desde que as espécies divergiram.

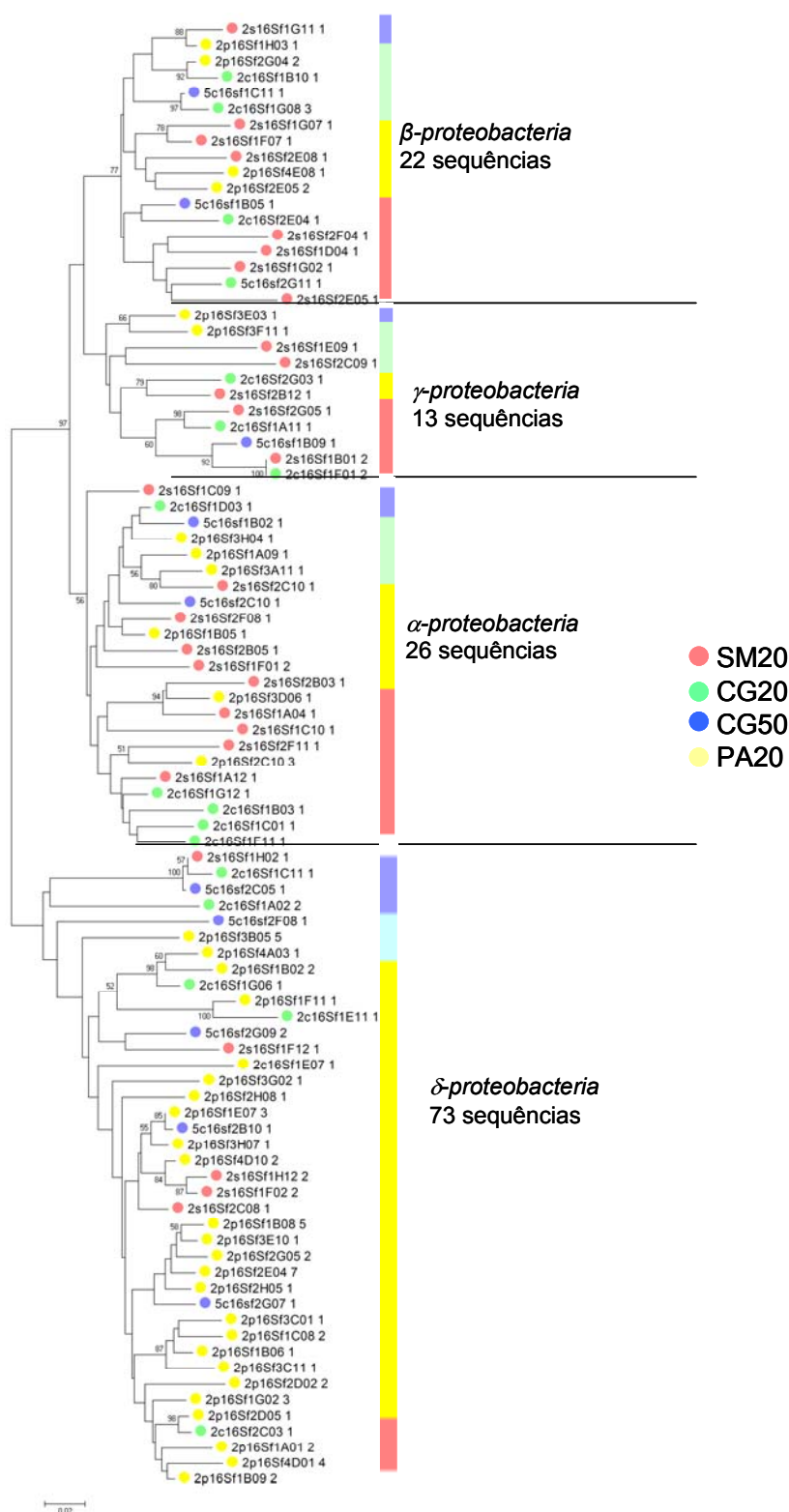


FIGURA 12 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *PROTEOBACTERIA*. Relações filogenéticas das OTU_{0.03} de *Proteobacteria* e suas áreas de origem. Cada círculo representa uma diferente OTU_{0.03} e o identificador dos clones usado como representativo para a OTU está indicado seguido do número de clones para a OTU. Cada biblioteca é indicada por uma cor diferente, como mostrado à direita da figura. A barra indica a proporção de sequências dentro de cada classe. Filogenias foram estimadas por *neighbor joining*, usando o modelo de substituição Tamura Nei e correção gamma ($\gamma=0,6241$). A árvore não está enraizada. A barra de escala representa o número de substituições por nucleotídeo, desde que as espécies divergiram.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES DE *ARCHAEA* DAS TURFEIRAS DOS CAMPOS DE ALTITUDE PARANAENSES

5.3.1 SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NÃO QUIMÉRICAS DO GENE *SSU rRNA* DE *ARCHAEA*

O mesmo DNA ambiental utilizado como molde para a construção das bibliotecas bacterianas foi também usado para a amplificação do gene *SSU rRNA* de *Archaea*. Desta forma, o DNA total das amostras compostas dos organossolos coletados a 20 cm de profundidade na Serra do Mar (SM20) e Palmas (PA20) e a 20 cm e 50 cm de profundidade coletados nos Campos Gerais (CG20 e CG50, respectivamente) foi utilizado para a construção de 4 bibliotecas do gene *SSU rRNA* de *Archaea* em *E. coli* DH5 α . No total foram coletados 1.152 clones (288 clones por biblioteca). Após a extração do DNA plasmidial e sequenciamento do gene *SSU rRNA* com os oligonucleotídeos iniciadores 21F e 958R (item 4.6.6), 664 sequências consensos do gene *SSU rRNA* foram obtidas utilizando-se o pacote de programas Phred-Phrap-Consed.

Sequências quiméricas foram retiradas pelos programas: Pintail, usando como referência sequências de *Archaea* do banco de RNA ribossômico Silva; Mallard; e Bellerophon (item 4.7.2). Ao final, 542 sequências do gene *SSU rRNA* foram selecionadas (SM20 = 144, CG20 = 120, CG50 = 133 e PA = 145 sequências).

5.3.2 ANÁLISE DE COBERTURA PARA DIFERENTES NÍVEIS TAXONÔMICOS DE ARCHAEA

Visando uma análise filogenética acurada e reprodutível, as sequências não quiméricas de *Archaea* foram alinhadas pelo programa Infernal (NAWROCKI E EDDY, 2009) e editadas pelo programa GBlocks (CASTRESANA, 2000), produzindo ao final sequências do gene *SSU rRNA* com tamanho médio de 790 pares de bases, compreendendo as regiões V2, V3, V4 e V5. A figura 13 mostra os histogramas dos comprimentos/posições das sequências de nucleotídeos selecionadas para cada biblioteca.

Matrizes de distâncias genéticas foram, então, calculadas usando os modelos de substituição mais adequados para cada biblioteca, segundo o *Akaike Information Criterion* (POSADA e BUCKLEY, 2004) (TABELA 8).

A partir das matrizes, as sequências do gene *SSU rRNA* foram agrupadas em OTU's pelo critério baseado na distância genética, através do programa Mothur (SCHLOSS *et al.*, 2009) e curvas de rarefação para distâncias genéticas referentes a espécies, a gêneros, a classes e a filos foram geradas (FIGURA 14 e 15).

Todos os níveis taxonômicos apresentaram uma elevada riqueza de OTU's. Os solos com 20 cm de profundidade do Segundo (CG20) e do Terceiro Planalto (PA20) apresentaram maior riqueza de OTU's em todos os níveis analisados. As riquezas de espécies, gêneros, classes e filos das amostras SM20 e CG50 parecem ser muito próximas (FIGURA 14 e 15). Comparações das curvas de rarefação indicam que a riqueza de espécies (OTU_{0.03}) de bactéria é maior do que a de arquea nos organossolos das turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses (FIGURA 16 a e b), exceto as bibliotecas CG50 de bactéria e PA20 de arquea, que apresentaram riquezas de espécies similares (FIGURA 16 a).

TABELA 8 - MODELOS DE SUBSTITUIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS USADOS PARA GERAR A MATRIZ DE DISTÂNCIA GENÉTICA DE *ARCHAEA*

Biblioteca	Nº de seqüências	Modelos-AIC	G	I
SM20	114	GTR	0,505	0,0637
CG20	98	GTR	0,627	0,1182
CG50	94	GTR	0,5578	0,0848
PA20	259	GTR	0,5516	0,1122
Arquea	565	GTR	0,6079	0,0739

NOTA: AIC = *Akaike Information Criterion*; GTR = *General Time Reversible* (WADDELL e STEEL, 1997). G = fator de correção gamma para sítios variáveis; I = Proporção de sítios invariáveis; Arquea: biblioteca contendo as seqüências SM20, CG20, CG50 e PA20.

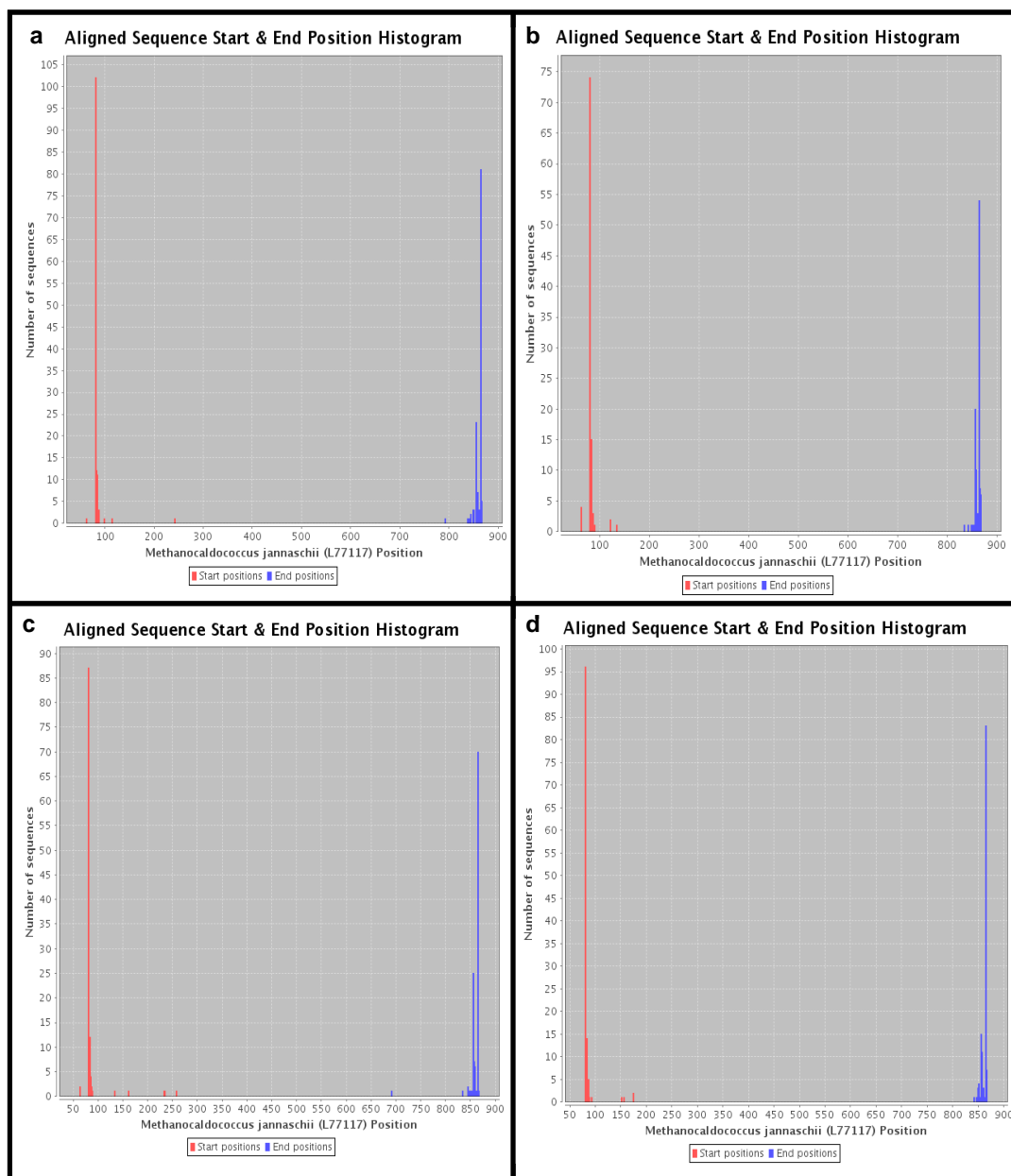


FIGURA 13 - HISTOGRAMA DAS SEQUÊNCIAS DO GENE *SSU rRNA* DE *ARCHAEA*. Histograma das sequências não quiméricas do gene *SSU rRNA* alinhadas com o programa Infernal (NAWROCKI e EDDY, 2009). Na ordenada está representado o número de sequências e na abscissa a posição dos nucleotídeos do gene *SSU rRNA* de *Methanocaldococcus jannaschii* (L77117) como referência. Em vermelho é mostrada a posição do primeiro e em azul a do último nucleotídeo das sequências analisadas. As bibliotecas estão representadas por letras minúsculas: (a) SM20, (b). CG20, (c). CG50 e (d). PA20.

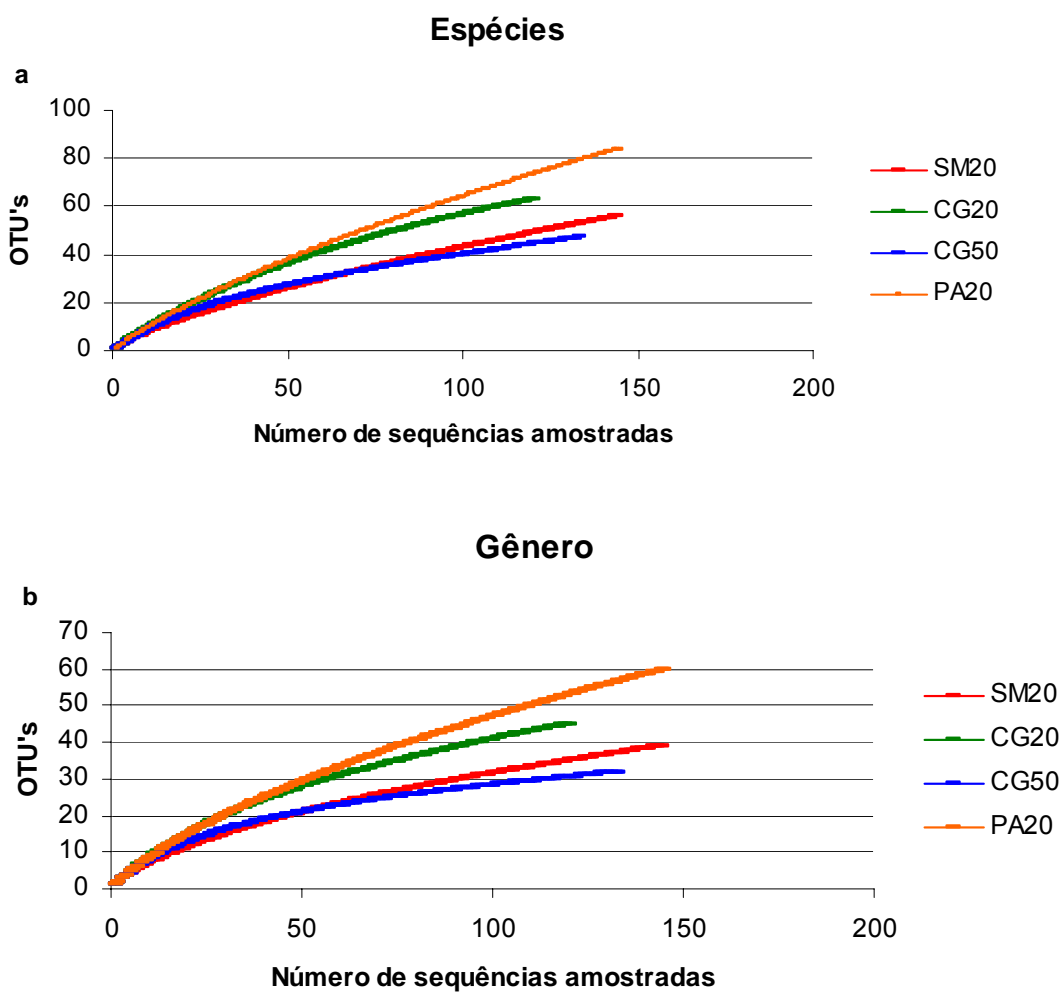


FIGURA 14 – CURVAS DE RAREFAÇÃO DE *ARCHAEA* PARA NÍVEIS DE ESPÉCIE E GÊNERO. Curvas de rarefação das bibliotecas do gene *SSU rRNA* de arquea. Sequências que apresentaram uma identidade maior que 97% e 95% foram agrupadas em OTU's como sendo da mesma espécie (a) e gênero (b), respectivamente (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005; 2006).

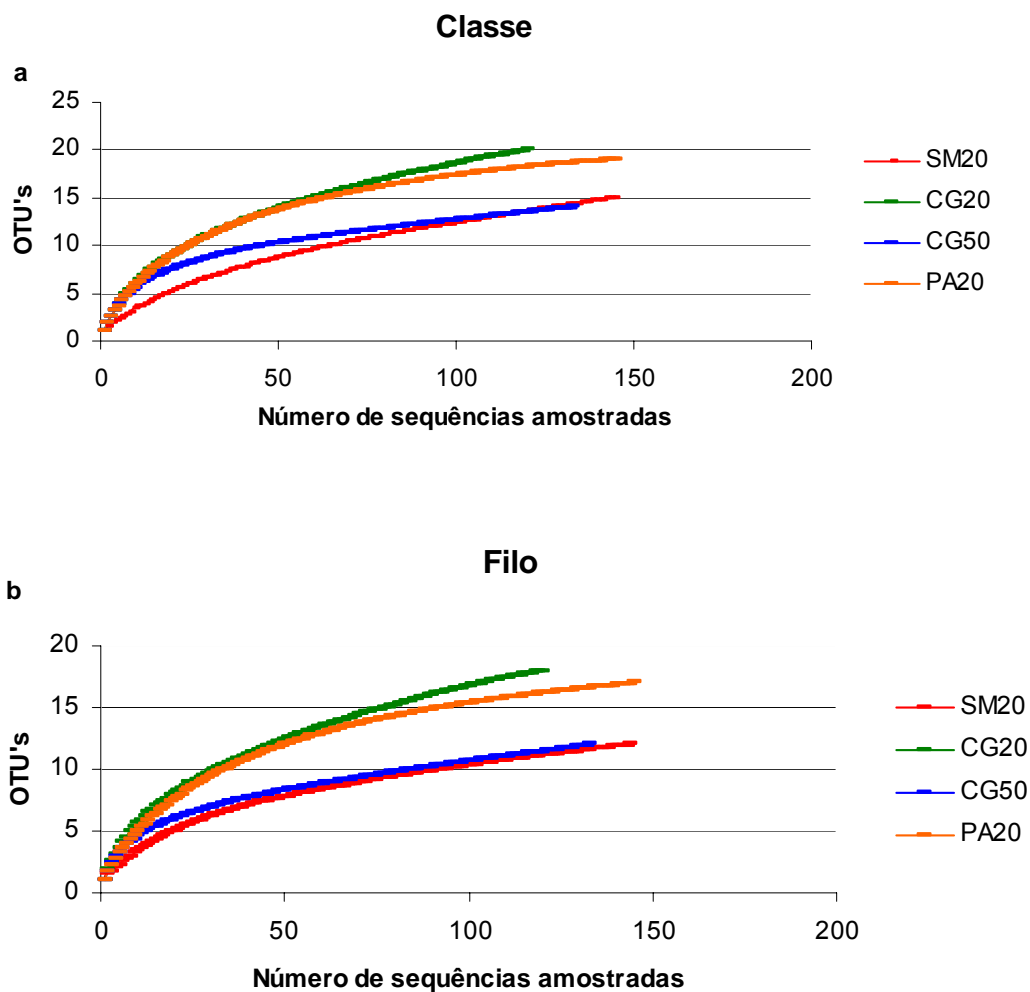


FIGURA 15 – CURVAS DE RAREFAÇÃO DE *ARCHAEA* PARA NÍVEIS DE CLASSE E FILO. Curvas de rarefação das bibliotecas do gene *SSU rRNA* de arquea. Sequências que apresentaram uma identidade maior que 85% e 80% foram agrupadas em OTU's como sendo da mesma classe (a) e filo (b), respectivamente (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005; 2006). Intervalos de confiança (95%) não estão apresentados no gráfico.

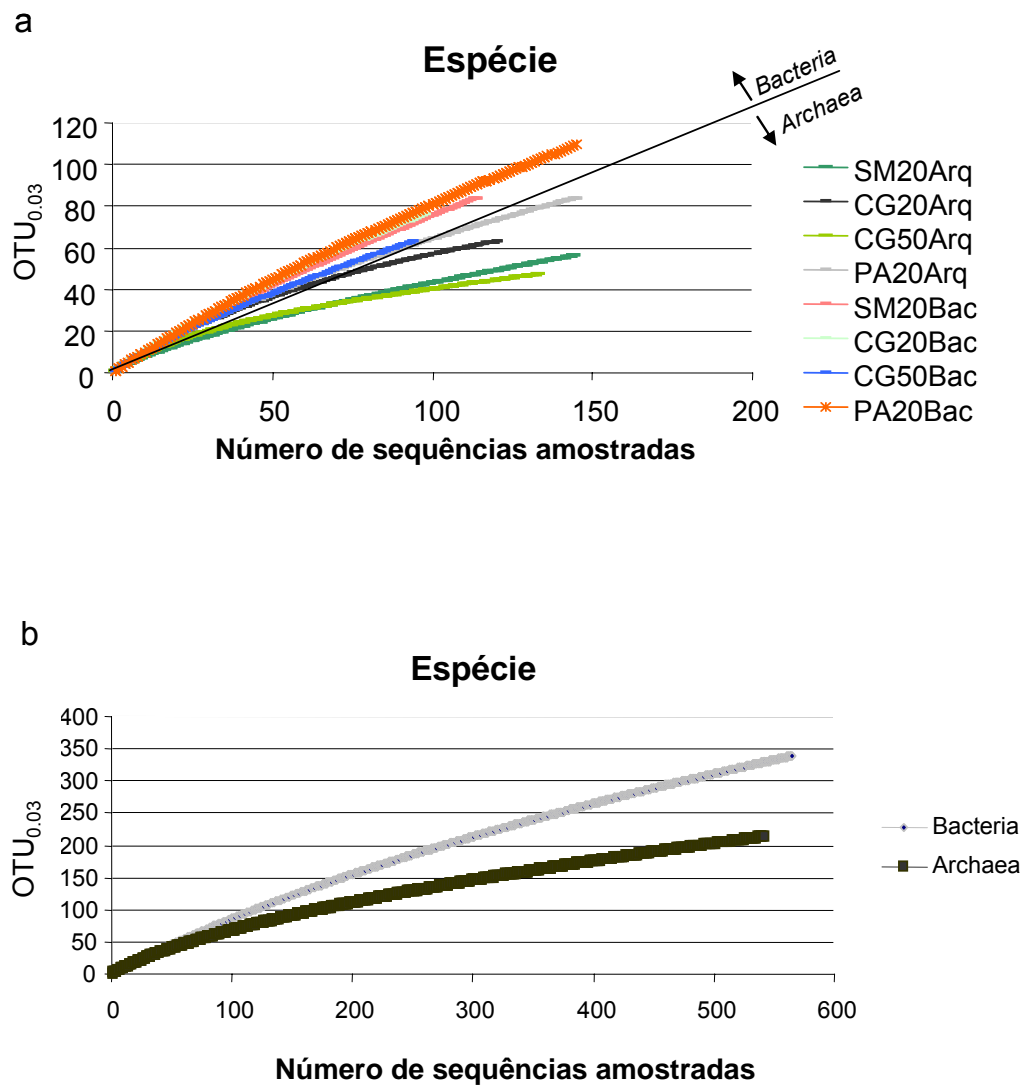


FIGURA 16 – CURVAS DE RAREFAÇÃO DE OTU_{0.03} DE *BACTERIA* E DE *ARCHAEA*. Curvas de rarefação do gene *SSU rRNA* de bactéria e arquea. Sequências foram agrupadas em OTU_{0.03} (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005; 2006). (a) Curvas de rarefação por biblioteca. As bibliotecas referentes às sequências do gene *SSU rRNA* de bactéria e de arquea estão representadas com o sufixo Bac e Arq, respectivamente. (b) Curvas de rarefação por Domínio.

5.3.3 COMPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DO GENE SSU *rRNA* DE *ARCHAEA*

Comparação das bibliotecas pelo programa β -Libshuff mostrou que as comunidades de *Archaea* são significativamente diferentes nas quatro amostras estudadas, com *P value* < 0,0042 (valor de *P* após correção de Bonferroni = 0,05/12 comparações) em todas as comparações par a par (TABELA 9). Para determinar a similaridade entre as amostras, análises de agrupamento foram realizadas usando dois diferentes métodos: o Unifrac (*Unifrac metric*) e a dissimilaridade de Bray-Curtis. Os dois dendogramas dividiram as quatro comunidades em dois grupos, ficando SM20 e PA20 em um ramo e CG20 e CG50 em outro (FIGURA 17 A e B). Diferente das comunidades de bactéria, as comunidades de arquea do Terceiro Planalto se mostraram mais similares com as da Serra do Mar do que com as dos Campos Gerais. Além disso, os resultados sugerem que a profundidade amostrada (CG20 e CG50) interfere menos na composição de bactérias e arqueas do que a distância geográfica (SM20, CG20 PA20) (FIGURA 8 e 17).

TABELA 9 - COMPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DO GENE *SSU rRNA* DE *ARCHAEA* PELO PROGRAMA J-LIBSHUFF

Comparação	Valor de <i>P</i>
CG20-CG50	<0,0001
CG50-CG20	<0,0001
CG20-PA20	<0,0001
PA20-CG20	<0,0001
CG20-SM20	<0,0001
SM20-CG20	<0,0001
CG50-PA20	<0,0001
PA20-CG50	0,0001
CG50-SM20	<0,0001
SM20-CG50	<0,0001
PA20-SM20	<0,0001
SM20-PA20	<0,0001

NOTA: Bibliotecas que tiveram valores de $P > 0,0042$ nas duas comparações par a par são consideradas como similares e que tiveram valores de $P < 0,0042$ são consideradas diferentes.

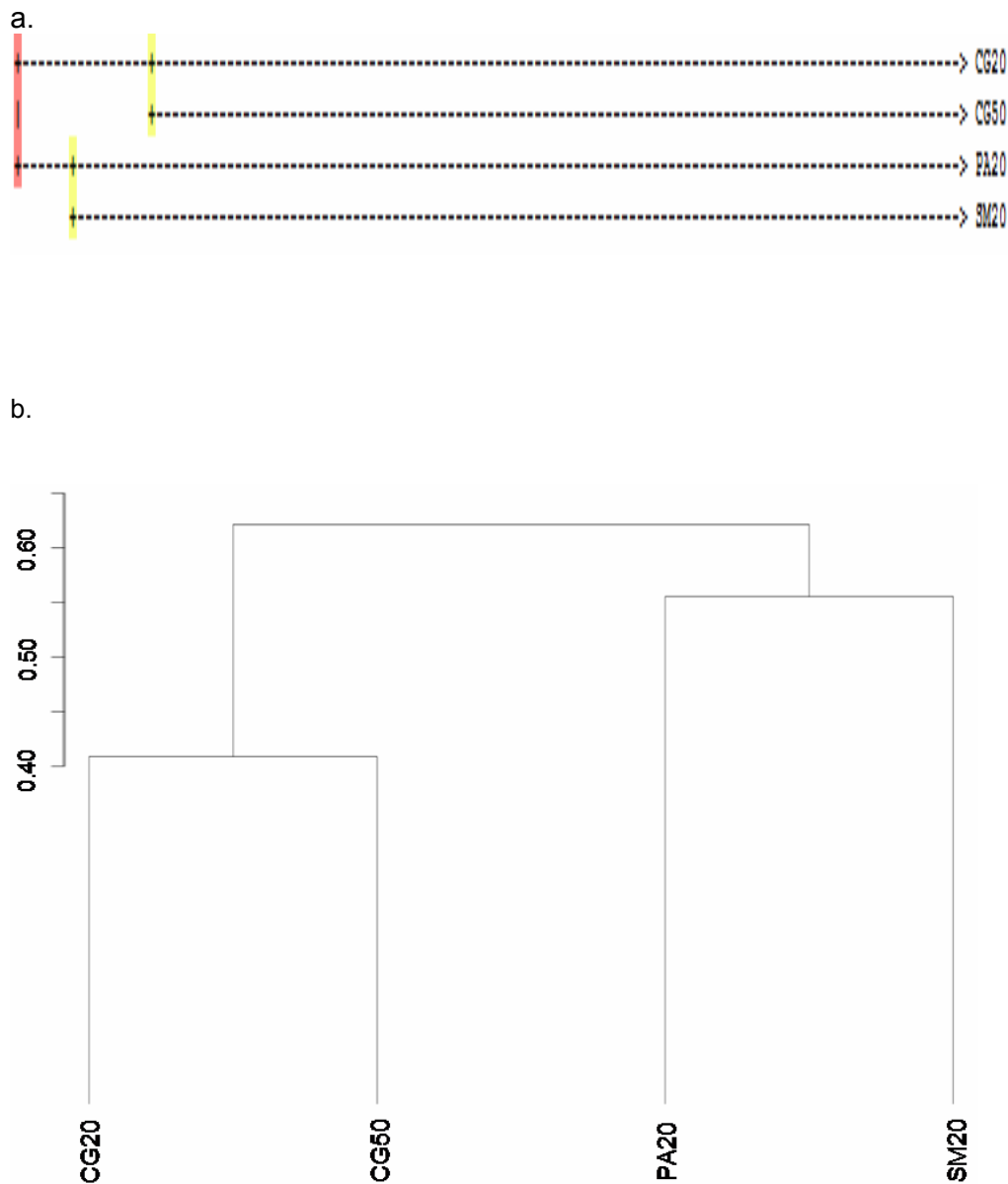


FIGURA 17 – AGRUPAMENTO DAS BIBLIOTECAS DO GENE *SSU rRNA* DE *ARCHAEA*. Dendogramas obtidos com o algoritmo UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*). (a) Dendograma gerado pelo programa Unifrac das bibliotecas de archaea usando a estatística de amostragem Jackknife, com número de sequências corrigido para 120 e com 100 permutações. As cores indicam a posição do nó: vermelho em >99,9% e amarelo em 90-99,9% das permutações. Escala: 1 traço representa 0,0033 unidades do comprimento do ramo. (b) Dendograma gerado pelo programa R, baseado nos valores de dissimilaridade de Bray-Curtis entre as OTU_{0.03} das comunidades de archaea. Os resultados foram obtidos depois de 100 permutações dos dados.

5.3.4 CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS TÁXONS DE ARCHAEA

As 542 sequências não quiméricas do gene *SSU rRNA* de arquea foram comparadas com o banco de dados Silva (item 4.12) usando o programa Mothur. Essas sequências perteceram a dois filos: *Euryarchaeota* (10%) e *Crenarchaeota* (90%), com a predominância dos grupos MCG (do inglês, *Miscellaneous Crenarchaeotal Group*) (58%) e TG (do inglês, *Terrestrial Group*) (24%) (FIGURA 18).

A comunidade de arquea presente em 50 cm de profundidade mostrou menor porcentagem de OTU_{0.03} compartilhadas (41%). As amostras coletadas a 20 centímetros de profundidade tiveram porcentagens similares (SM20 – 74%; PA20 – 69%; CG20 – 67%) (FIGURA 19). As quatro bibliotecas compartilharam quatro OTU_{0.03} pertencendo a MCG e TG (TABELA 9).

Foram encontrados 7 grupos de arqueas metanogênicas nas turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses (FIGURA 20). Comparações par a par entre as bibliotecas indicaram que OTU_{0.03} dos grupos *Methanomicrobiaceae* e Rice_ClusterII foram compartilhadas entre as amostras SM20-PA20, OTU_{0.03} do grupo GOM_ArcI foram compartilhadas entre as amostras CG20-PA20 e OTU_{0.03} de Rice_ClusterII foram compartilhadas entre as amostras CG50-PA20 (TABELA 10). As amostras coletadas na mesma área em diferentes profundidades (CG20-CG50) não compartilharam OTU_{0.03}, sugerindo que a profundidade pode influenciar na distribuição das arqueas metanogênicas.

Análises filogenéticas das sequências pertencentes ao filo *Crenarchaeota* revelaram a presença de dois grupos: um contendo a maioria dos táxons MCG das amostras SM20 e PA20 e outro com a maioria dos táxons TG das amostras CG20 e CG50 (FIGURA 21). Isso claramente mostra que os táxons destes dois grupos foram os responsáveis pela similaridade observada entre SM20 e PA20 e entre CG20 e CG50.

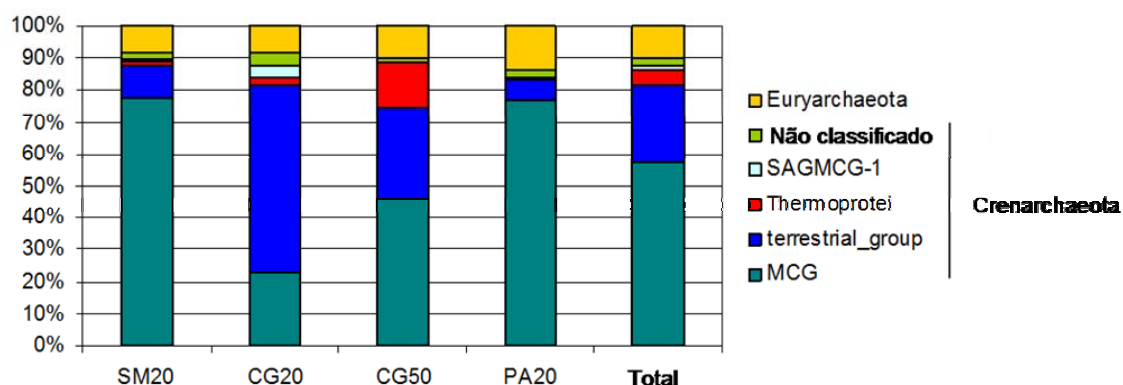
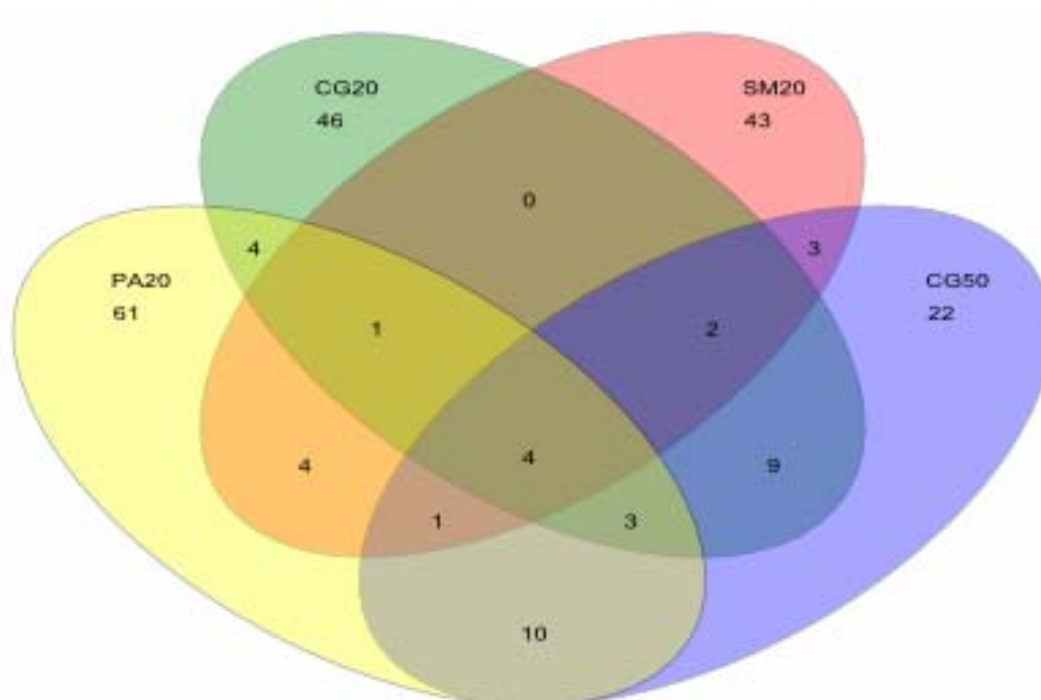


FIGURA 18 - PORCENTAGEM DE DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS DE *ARCHAEA*. Sequências do gene *SSU rRNA* foram comparadas com o banco de dados Silva (disponível no sítio: http://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files, acessado em 20/11/2010), para afiliação taxonômica, usando o programa Mothur e um *cutoff* de 80%. Total: biblioteca contendo as sequências SM20, CG20, CG50 e PA20.



Biblioteca (Turfeira - profundidade)	Posição Fisiográfica	OTU _{0.03}	
		Não compartilhadas	Compartilhada
SM20 (Serra do Mar – 20 cm)	Serra do Mar	43 (74,1%)	15 (25,9%)
CG20 (Campos Gerais – 20 cm)	Segundo Planalto	46 (66,7%)	23 (33,3%)
CG50 (Campos Gerais – 50 cm)	Segundo Planalto	22 (40,8%)	32 (59,2%)
PA20 (Palmas – 20 cm)	Terceiro Planalto	61 (69,3%)	27 (30,7%)

FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO DAS OTU_{0.03} DE *ARCHAEA*. Diagrama de Venn comparando as OTU_{0.03} presentes nas bibliotecas SM20, CG20, CG50 e PA20. Abaixo é mostrada a porcentagem de OTU_{0.03} compartilhada e não compartilhada entre as bibliotecas.

TABELA 10 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS OTU_{0.03} DE *ARCHAEA* COMPARTILHADAS ENTRE AS BIBLIOTECAS

Bibliotecas	OTU _{0.03} Compartilhadas	Sequências	Classificação taxonômica mais profunda
SM20 CG20	7	56	Terrestrial Group (3) e MCG (4).
SM20 CG50	10	100	Terrestrial Group (3), Rice_ClusterII (2) e MCG (5).
SM20 PA20	10	64	Terrestrial Group (2), <i>Methanomicrobiaceae</i> (1), Rice_ClusterII (1) e MCG (6).
CG20 CG50	18	107	MCG (7), <i>Thermoprotei</i> (1) e Terrestrial Group (10).
CG20 PA20	12	56	Terrestrial Group (1), GOM_ArcI (1) e MCG (10).
PA20 CG50	18	99	Terrestrial Group (3), Rice_ClusterII (1), <i>Thermoprotei</i> (1) e MCG (13).
SM20 CG20 CG50	6	68	Terrestrial Group (3) e MCG (3).
SM20 CG20 PA20	5	58	Terrestrial Group (1) e MCG (4)
SM20 CG50 PA20	5	62	Terrestrial Group (1) Rice_ClusterII (1) e MCG (3).
CG20 CG50 PA20	7	60	Terrestrial Group (1) e MCG (6).
SM20 CG20 CG50 PA20	4	66	MCG (3) e Terrestrial Group (1).

NOTA: Valores entre parênteses correspondem ao número de OTU_{0.03} para um determinado táxon; sequências foram comparadas usando o programa Mothur e o banco de dados Silva como referência (disponível no sítio: http://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files, acessado em 20/11/2010).

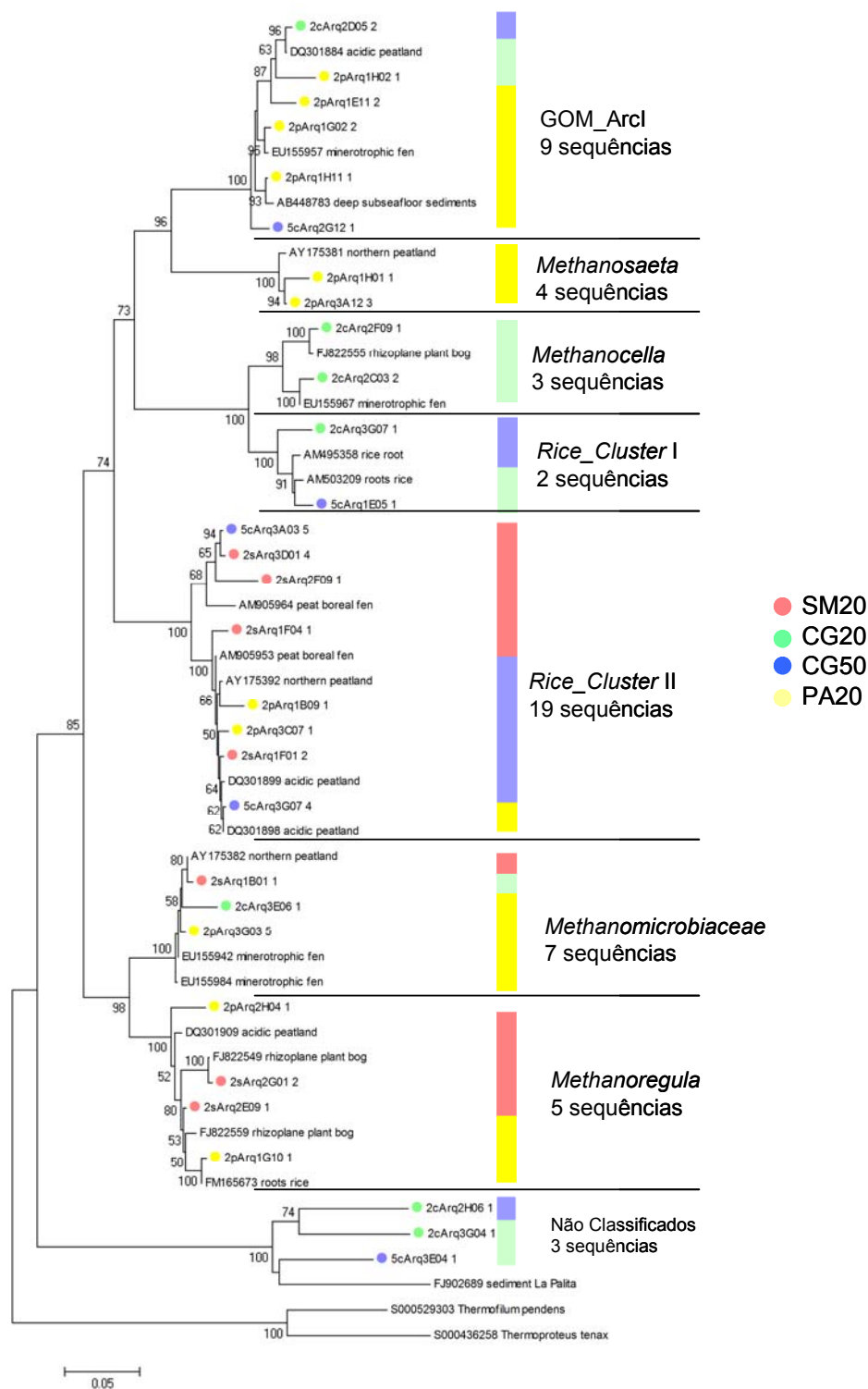


FIGURA 20 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE METANOGÊNICAS. Relações filogenéticas das OTU_{0.03} de arqueas *metanogênicas* e suas áreas de origem. Cada círculo representa uma diferente OTU_{0.03} e o identificador dos clones usado como representativo para a OTU está indicado, seguido do número de clones para a OTU. Cada biblioteca é indicada por uma cor diferente, como mostrado à direita da figura. A barra indica a proporção de sequências dentro de cada grupo. Filogenias foram estimadas por *neighbor joining*, usando o modelo de substituição Tamura Nei e correção gamma ($\gamma = 1,0852$). A árvore não está enraizada. A barra de escala representa o número de substituições por nucleotídeo, desde que as espécies divergiram.

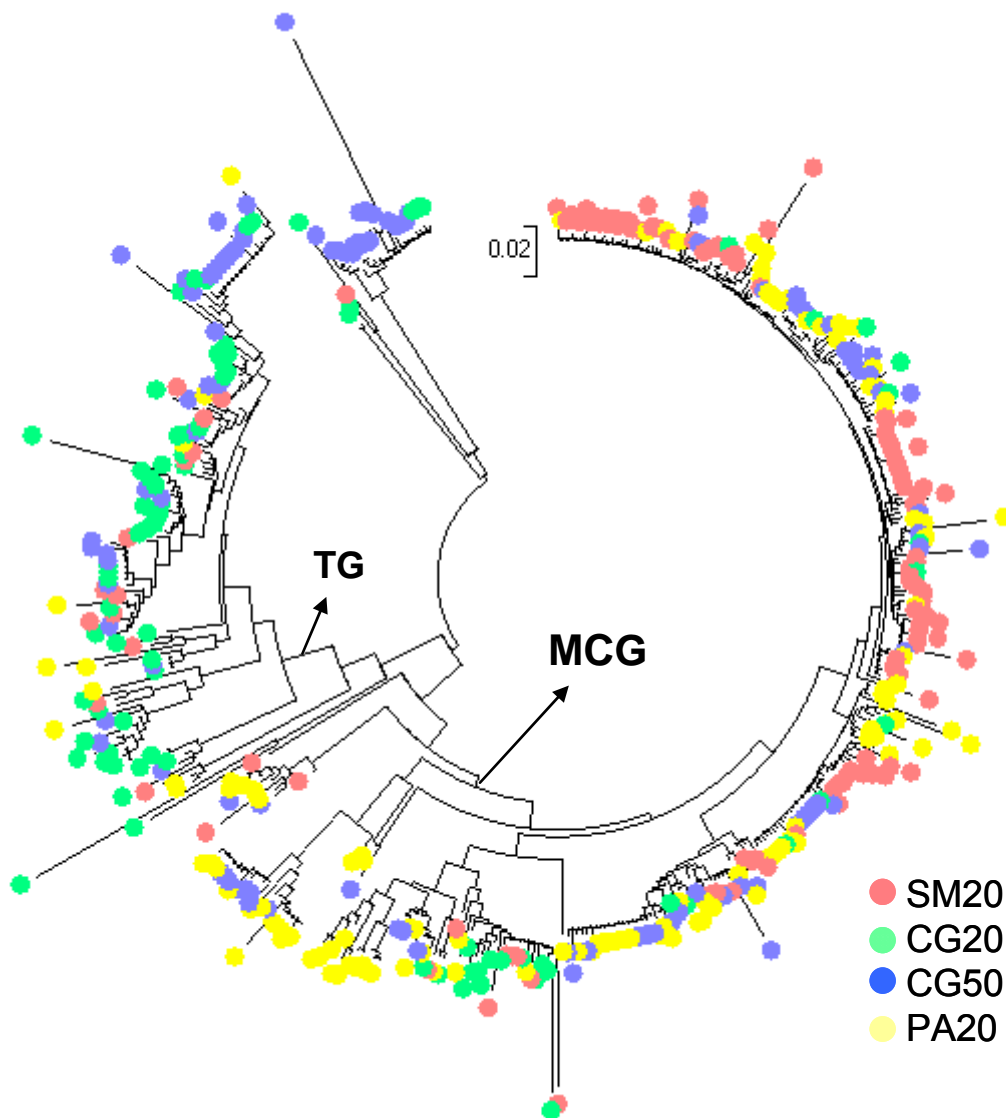


FIGURA 21 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *CRENARCHAEOTA*. Relações filogenéticas das sequências do gene *SSU rRNA* do filo *Crenarchaeota* e suas áreas de origem. Cada círculo representa uma sequência diferente do gene *SSU rRNA*. Cada cor representa uma área diferente como mostrado na figura. Filogenia foi estimada por *neighbor joining*, usando o modelo de substituição LogDet. A árvore não está enraizada. A barra de escala representa o número de substituições por nucleotídeo, desde que as espécies divergiram. TG: *Terrestrial Group* e MCG: *Miscellaneous Crenarchaeotal Group*.

5.4 DIVERSIDADE PROCARIÓTICA DAS TURFEIRAS DOS CAMPOS DE ALTITUDE PARANAENSES

Perfis de diversidade de Renyi foram obtidos a partir de OTU_{0.03} para classificar as comunidades procarióticas. A classificação baseada nesse perfil é preferencial à baseada em índices únicos porque a ordem pode mudar quando diferentes índices são usados (KINDT e COE, 2005). Os organossolos do Terceiro (PA20) e do Segundo Planalto (CG20) coletados a 20 cm de profundidade apresentaram maior diversidade de procariotos (FIGURA 22). Comunidades com perfis de diversidade de Renyi que se cruzaram (FIGURA 22) não apresentaram similaridade na composição taxonômica. Os perfis (SM20 e CG50) mostraram diferenças em níveis distintos de diversidade (riqueza e diversidade considerando abundância/dominância), mas por serem valores pontuais, não tem como indicar similaridade em composição. A composição das comunidades de *Archaea* e *Bacteria* das bibliotecas CG50 foi mais próxima de CG20 do que de SM20, como mostrado nas figuras 10 e 21.

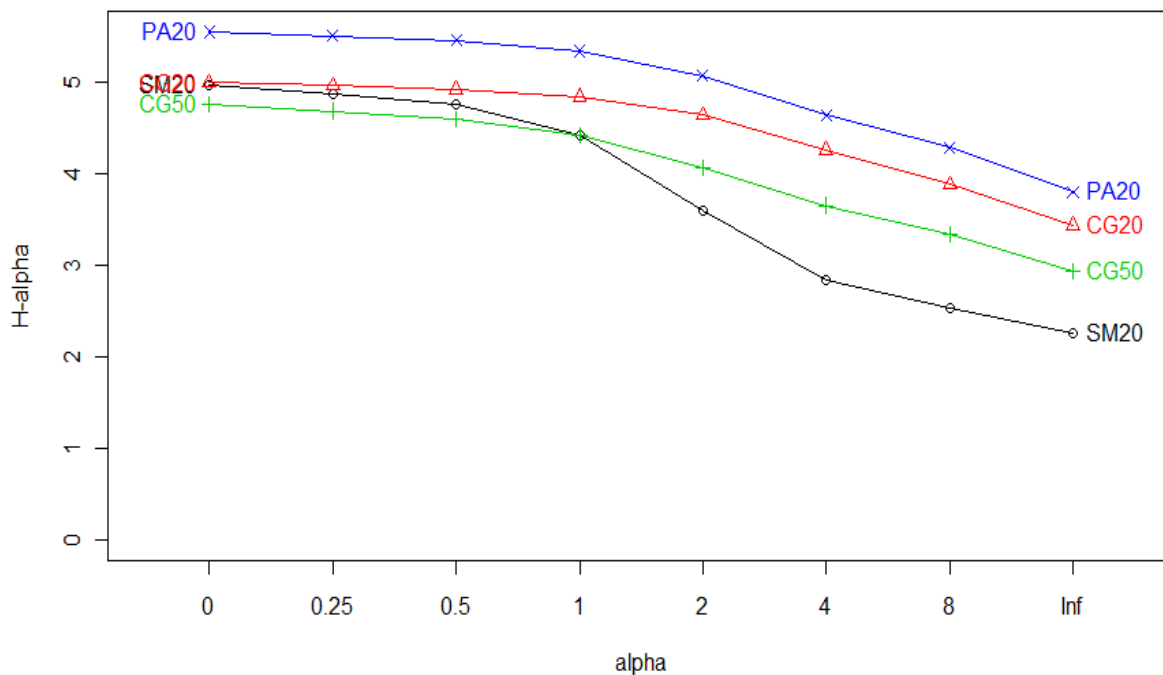


FIGURA 22– PERFIL DE DIVERSIDADE DE RENYI DAS COMUNIDADES PROCARIÓTICAS. Comparação dos perfis de diversidade de Renyi das comunidades procarióticas dos organossolos das turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses. Os valores de $\alpha = 0, 1, 2$ e infinito (inf) indicam riqueza de espécies, índice de diversidade de Shannon, logaritmo da recíproca do índice de diversidade de Simpson e índice de diversidade de Berger Parker, respectivamente (MAGURRAN 1988; LEGENDRE e LEGENDRE 1998; SHAW, 2003). Se o perfil de uma amostra for maior do que o perfil de outra amostra, a amostra com maior perfil pode ser considerada mais diversa. Quando curvas de duas comunidades se cruzam, isto significa que elas não podem ser classificadas.

6.0 DISCUSSÃO

As comunidades microbianas dos organossolos das turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses sofrem grande influência do *Sphagnum*, musgo dominante nesse ecossistema. A importância atribuída ao *Sphagnum* é decorrente da sua habilidade em tornar o solo um ambiente mais seletivo, uma vez que contribui para a manutenção do ambiente anóxico, ao armazenar até 20 vezes o seu peso seco em água, além de diminuir o pH local ao liberar ácidos e prótons e secretar substâncias com atividades antimicrobianas (DANIELS e EDDY, 1985; RUDOLPH e SAMLAND, 1985; STALHEIM *et al.*, 2009). O solo formado da deposição do *Sphagnum* é também rico em celulose uma vez que a parede celular desse musgo não contém lignina (KREMER *et al.*, 2004).

As comunidades bacterianas dos organossolos das turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses foram dominadas por *Acidobacteria* (33,8%) e *Proteobacteria* (26,2%). Esses dois grupos foram também dominantes nas turfeiras de *Sphagnum* do Hemisfério Norte (DEDYSH *et al.*, 2006; PANKRATOV *et al.*, 2011a). Além da influência do baixo pH dos organossolos (TABELA 4) (HARTMAN *et al.*, 2008), a abundância de *Acidobacteria* nessas turfeiras pode estar relacionada com a grande disponibilidade de celulose presente nesses solos. Um estudo recente sugere que os membros do filo *Acidobacteria* podem estar envolvidos no processo de degradação da celulose em turfeiras ácidas do norte da Rússia (PANKRATOV *et al.*, 2011a). Além disso, o sequenciamento dos genomas de *Acidobacterium capsulatum*, *Candidatus Koribacter versatilis* estirpe Ellin345 e *Candidatus Solibacter usitatus* estirpe Ellin6076 indicou a presença de genes codificantes de celulases, sugerindo que estes organismos são capazes de degradar celulose, embora não tenha sido realizado nenhum teste fisiológico (WARD *et al.*, 2009). Recentemente, dois isolados de *Acidobacteria* (estirpes KBS 83 e KBS 96), obtidos de solos agrícolas, e a espécie *Telmatobacter bradus* estirpe TPB6017, isolada de turfeiras de *Sphagnum*, apresentaram também potencial para degradar celulose (EICHORST *et al.*, 2011; PANKRATOV *et al.*, 2011b). Todas as espécies citadas anteriormente pertenceram à subdivisão *Gp1*, com exceção das estirpes Ellin 6076 e KBS 96 da subdivisão *Gp3*. Essas duas subdivisões somadas compreendem mais de 45% dos táxons de

Acidobacteria (FIGURA 11) encontrados nas turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses.

O fato de a turfeira dos Campos Gerais apresentar maior abundância de *Acidobacteria* (FIGURA 10) e também o maior teor de matéria orgânica (TABELA 4) pode ser explicado em parte pelo metabolismo particular desse grupo. A taxa de crescimento das espécies de *Acidobacteria* citadas anteriormente foi extremamente lenta. A taxa de degradação da celulose por estas bactérias parece ser também muito lenta, não sendo comparáveis àquelas observadas em bactérias decompositoras de celulose já bem caracterizadas (EICHORST *et al.*, 2007; PANKRATOV *et al.*, 2011a). Acredita-se, portanto, que a taxa de deposição de matéria orgânica nos organossolos estudados deva ser maior do que a degradação realizada por *Acidobacteria*.

A pequena população de *Bacteroidetes* (3,4%) (FIGURA 10) pode ter contribuído para o elevado teor de matéria orgânica nos organossolos (TABELA 4), uma vez que representantes desse filo têm se mostrado decompositores de biopolímeros (KIRCHMAN, 2002; PANKRATOV *et al.*, 2006; 2007; XIE *et al.*, 2007). Os gêneros *Mucilaginibacter* e *Chitinophaga* das famílias *Sphingobacteriaceae* e *Chitinopagaceae*, respectivamente, são conhecidos degradadores de heteropolissacarídeos (PANKRATOV *et al.*, 2006; 2007). O gênero *Flavobacterium* da família *Flavobacteriaceae* é conhecido por decompor quitina (KIRCHMAN, 2002) e a espécie *Cytophaga hutchinsonii*, da família *Cytophagaceae*, um potente consumidor de celulose (XIE *et al.*, 2007). Todos os representantes de *Bacteroidetes* encontrados nos organossolos desse estudo pertenceram às famílias *Sphingobacteriaceae*, *Chitinopagaceae* e *Flavobacteriaceae*, nenhuma sequência foi classificada como pertencente à família *Cytophagaceae* (ANEXO 3). A capacidade de degradar celulose também tem sido descrita em membros de *Actinobacteria* (1,4%), *Gamaproteobacteria* (2,3%) e *Firmicutes* (4,2%) (FIGURA 10) (WIRTH e ULRICH, 2002; DEDYSH *et al.*, 2006; BRUCE *et al.*, 2010), grupos também pouco abundantes nessas turfeiras.

Das três áreas estudadas, PA20 foi a única que apresentou maior número de representantes do filo *Proteobacteria* do que *Acidobacteria*. Baseado no fato de que a razão *Proteobacteria/Acidobacteria* está correlacionada com o estado trófico do solo (SMIT *et al.*, 2001; HARTMAN *et al.*, 2008), PA diverge das outras amostras nessa característica provavelmente por causa da interferência antrópica decorrente

da agricultura em áreas próximas. *Proteobacteria* é o maior e o mais diverso grupo de bactérias cultivadas. Dentre alguns dos papéis desempenhados por esse grupo está a participação ativa no ciclo do nitrogênio, o que provavelmente justifica a presença do grande número desses microrganismos nessas áreas mais antropizadas (NÜSSLEIN e TIEDJE, 1999).

O filo *Proteobacteria* presente nos organossolos das turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses foi dominado por δ - (56,8%) e α -*proteobacteria* (16,1%) (FIGURA 12). Mais de 70% das δ -*proteobacteria* (52 sequências) não foram classificadas no banco de genes SSU rRNA do *Ribosomal Database Project*, sugerindo a existência de novos gêneros (ANEXO 3). A classe α -*proteobacteria* também predominou nas turfeiras de *Sphagnum* do Oeste da Sibéria (DEDYSH *et al.*, 2006). Entretanto, nessas turfeiras, aproximadamente 10% das sequências do gene SSU rRNA foram relacionadas com α -*proteobacterias* metanotróficas pertencentes ao gênero *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylocella* e *Methylocapsa* (DEDYSH *et al.*, 2006). Nas turfeiras dos Campos de Altitude, somente 0,7% de todas as sequências do gene SSU rRNA foram relacionadas com bactérias metanotróficas (famílias *Methylococcaceae* e *Methylocystaceae*), com somente 0,2% mostrando maior probabilidade (>95%) de pertencer ao gênero *Methylocystis* (ANEXO 3).

Para a identificação específica de bactérias metanotróficas foram também utilizados nesse trabalho os oligonucleotídeos iniciadores A189F/A682R (ANEXO 5), usados para detectar o gene *pmoA*, que codifica a subunidade alfa da enzima particulada Metano Monoxigenase ligada à membrana (pMMO), o primeiro passo da oxidação do metano a CH₃OH (HOLMES *et al.*, 1995). O pMMO é presente em todas as bactérias metanotróficas, com exceção das espécies *Methylocella*, que têm uma forma solúvel citoplasmática (sMMO) (HANSON e HANSON, 1996; HORZ, YIMGA e LIESACK, 2001). Esses oligonucleotídeos iniciadores foram testados em diversas condições de PCR, incluindo aquela sugerida pelos autores e nenhum produto de amplificação foi obtido (dado não mostrado).

Entretanto a pequena população de bactérias oxidantes de metano nos organossolos não significa que esse grupo de microrganismos não possa ocupar outros nichos em maior número nesse ecossistema. Estudos recentes têm mostrado a presença de bactérias metanotróficas endofíticas em *Sphagnum*

(RAGHOEBARSING *et al.*, 2005; LARMOLA *et al.*, 2010). Larmola e colaboradores (2010), ao testarem 23 das 41 espécies de *Sphagnum* presentes nas turfeiras da Finlândia, sugeriram que todas as espécies de *Sphagnum* de turfeiras são potencialmente capazes de abrigar bactérias metanotróficas endofíticas. Nesse estudo foi também demonstrado que a água presente no solo regula a atividade metanotrófica, por controlar a disponibilidade de O₂. A baixa abundância de bactérias metanotróficas observada no presente estudo pode ter sido, portanto, decorrente do tipo de amostra analisada. Todos os organossolos amostrados estavam abaixo do nível d'água, ou seja, em ambiente anóxico. Além disso, foram analisadas somente comunidades bacterianas presentes no organossolo. A ausência desse grupo de bactérias nessa faixa do solo não descarta, portanto, a sua presença e importância na manutenção das turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses.

A composição dos grupos dominantes no Segundo Planalto mudou com a profundidade (FIGURA 10) e o gênero *Ktedonobacter*, que inclui bactérias filamentosas gram-positivas, formadoras de esporos (CAVALETTI *et al.*, 2006), foi o segundo grupo mais abundante a 50 cm de profundidade (ANEXO 3). Um aumento proporcional na abundância de bactérias gram-positivas com a profundidade do solo foi também observado por Fierer e colaboradores (2003). Nesse trabalho os autores sugerem que a disponibilidade de nutrientes e de O₂ são os principais fatores responsáveis pela mudança na composição das comunidades microbianas. E que fatores como pH, temperatura e textura do solo provocam menos diferenciações nas comunidades, uma vez que esses fatores variam menos com o aumento da profundidade (FIERER *et al.*, 2003). De fato, foi observado que a estirpe SOSP1-21 do gênero *Ktedonobacter* é incapaz de degradar celulose e quitina, polissacarídeos que se encontram mais preservados nas camadas superiores das turfas (CAVALETTI *et al.*, 2006).

Estudos realizados no Hemisfério Norte indicaram que o filo *Verrucomicrobia* é o terceiro filo mais abundante nas turfeiras de *Sphagnum* (DEDYSH *et al.*, 2006; PANKRATOV *et al.*, 2011a). Diversos estudos baseados no sequenciamento do gene *SSU rRNA* têm sugerido que *Verrucomicrobia* é um dos filos dominantes nos solos (JANSSEN, 2006; KIELAK *et al.*, 2008). Ele tipicamente representa entre 2% e 8% da comunidade bacteriana, com maior densidade observada na rizosfera (KIELAK *et al.*, 2008). Entretanto nenhum representante desse filo foi descoberto nas turfeiras

da Serra do Mar (SM20) (FIGURA 10). Estas foram as únicas áreas de turfeiras rodeadas pela Floresta Atlântica Ombrófila Densa. Um estudo recente no solo dessa floresta também não encontrou nenhum representante desse filo (FAORO *et al.*, 2010). Entretanto a ausência deste filo no solo de florestas da Serra do Mar parece ser uma característica local ou decorrente da baixa cobertura de amostragem do gene *SSU rRNA*. Bruce e colaboradores (2010), ao estudar a diversidade bacteriana presente no solo da Floresta Atlântica da Serra do Mar, no Estado do Rio de Janeiro, detectaram a presença deste filo nas 6 amostras coletadas, variando entre 0,6 -14% dos filios identificados.

O filo *Chloroflexi* (4,8%) foi também pouco abundante nas turfeiras de *Sphagnum* (FIGURA 10). Mais da metade dos clones desse filo pertenceu à classe *Anaerolineae*. Membros dessa classe têm sido encontrados em reatores anaeróbicos atuando como heterotróficos fermentativos, degradando a matéria orgânica complexa, contribuindo para a produção do CH₄. Sua presença sugere a existência de metanogênicas hidrogênotróficas, já que membros dessa classe apresentaram maior taxa de crescimento quando cocultivados com esse grupo de *Archaea* (SEKIGUCHI, 2006; YAMADA e SEKIGUCHI, 2009).

Diferentemente do que foi observado nas turfeiras do Hemisfério Norte (JUOTTONEN *et al.*, 2008; CADILLO-QUIROZ *et al.*, 2010), metanogênicas não dominaram as comunidades de *Archaea* dos organossolos dos Campos de Altitude paranaenses. Nesses ecossistemas 90% das sequências pertenceram ao filo *Crenarchaeota*. Somente 49 sequências (9%) foram de metanogênicas que pertenceram ao filo *Euryarchaeota* (FIGURA 18). A possibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse trabalho terem favorecido a abundância do filo *Crenarchaeota* nas bibliotecas gênicas foi minimizada ao comparar as suas sequências com os genes *SSU rRNA* do *Ribosomal Database Project*. O oligonucleotídeo iniciador 21F alinhou com 8.566 sequências do gene *SSU rRNA* do filo *Euryarchaeota*, sendo 4.088 de metanogênicas e com 4.962 sequências do filo *Crenarchaeota*. O oligonucleotídeo 958R alinhou com 18.942 sequências do filo *Euryarchaeota*, sendo 10.651 de metanogênicas e com 8.541 sequências do filo *Crenarchaeota*. Além disso, um estudo realizado no mangue do litoral sul de São Paulo, utilizando os mesmos pares de oligonucleotídeos iniciadores, mostrou que aproximadamente 75% dos clones obtidos pertenceram ao

filo *Euryarchaeota*, os outros clones da biblioteca (25%) pertenceram ao filo *Crenarchaeota* (MENDES, 2009).

A suspeita de uma pequena população de *Archaea* produtora de metano nos organossolos amostrados foi aumentada com os resultados negativos de detecção do gene *mcrA* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ML-F/ML-R (ANEXO 5). O gene *mcrA* codifica a subunidade alfa da metil-coenzima M redutase que catalisa a redução do grupo metil para a formação do metano e é onipresente em todas as metanogênicas (LUTON *et al.*, 2002). Os oligonucleotídeos iniciadores ML-F/ML-R foram testados em diversas condições de PCR, incluindo a sugerida pelo autor e nenhum produto de amplificação foi obtido (dado não mostrado).

A pequena população de metanogênicas, detectada através do sequenciamento do gene *SSU rRNA*, pode ser decorrente da composição das comunidades bacterianas. Estudos realizados em turfeiras (HOJ *et al.*, 2005) e reatores anaeróbicos (GODON *et al.*, 2005; ARIESYADY *et al.*, 2007; NARIHIRO *et al.*, 2009) sugerem que a composição da comunidade bacteriana influencia a comunidade metanogênica, uma vez que a primeira é responsável pela disponibilização de substratos necessários para a produção de metano. Em reatores anaeróbicos produtores de metano, tem sido observada a predominância dos filos *Firmicutes*, *Chloroflexi* e *Bacteroidetes* (GODON *et al.*, 2005; ARIESYADY *et al.*, 2007; NARIHIRO *et al.*, 2009). O pequeno número de táxons desses três filos nos organossolos estudados pode estar associado com a baixa abundância de metanogênicas. Entretanto a influência de outros fatores determinantes na metanogênese, como a temperatura, a disponibilidade de O₂ e atributos físico-químicos devem ser também estudados para maiores inferências.

Dentro do filo *Crenarchaeota*, dois grupos foram dominantes: MCG (do inglês, *Miscellaneous Crenarchaeotal Group* - 58%) e TG (do inglês, *Terrestrial Group* - 24%) (FIGURA 18). MCG é encontrado em ambientes terrestres, marinhos, quentes, frios, superfície e subsuperfície (TESKE, 2006). Membros de MCG parecem ser os maiores oxidantes de metano sem a assimilação do carbono derivado do metano em sedimentos de subsuperfície no Peru (BIDDLE *et al.*, 2006). A presença desse grupo nas amostras SM20, CG20, CG50 e PA20 confirma sua distribuição cosmopolita. Entretanto, uma vez que eles já foram descobertos em diversos ecossistemas, não é possível correlacionar sua presença a uma função particular. O TG contém sequências de *Crenarchaeota* que foram principalmente

identificadas em amostras de solo e rizosfera, sendo considerado um grupo com ampla distribuição em ambientes terrestres (SLIWINSKI *et al.*, 2004, OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Representantes do grupo SAGMCG-1 (do inglês, *South Africa Gold Mine Crenarchaeotic Group-1*) foram somente encontrados em SM20 e CG20, compreendendo 1% das arqueas (FIGURA 18). A distância filogenética deste grupo com as demais sequências do filo *Crenarchaeota* sugere que as sequências de SAGMCG foram derivadas de novos membros de arquea que habitavam ambientes terrestres com baixo pH (TAKAI *et al.* 2001).

Enquanto a ecofisiologia e a função de *Crenarchaeota* permanecem pouco conhecidas devido à falta de isolados cultiváveis, o interesse científico no estudo de comunidades metanogênicas tem contribuído para a caracterização fisiológica deste grupo. No presente estudo, as sequências do gene *SSU rRNA* dos grupos — *Rice Cluster-I* (RC-I), *Rice Cluster-II* (RC-II), *Methanosaeta*, *Gulf of Mexico Arc I group* (GOM Arc I), *Methanomicrobiaceae*, *Methanoregula*, *Methanocella* — foram encontradas (ANEXO 4). O RC-I e RC-II têm sido encontrados em diferentes ecossistemas com metanogênese ativa, como turfeiras ácidas e arrozais (CHIN *et al.*, 1999; GALAND *et al.*, 2002; CADILLO-QUIROZ *et al.*, 2010). O grupo RC-I, encontrado somente no segundo planalto (amostras CG20-CG50) (FIGURA 20), é composto por metanogênicas hidrogenotróficas produtoras de metano em raízes de arroz (SAKAI *et al.*, 2007) por usar o H₂ gerado da fermentação de fotossintatos excretados (DANNENBERG e CONRAD, 1999). Esse grupo é particularmente abundante em arrozais, onde ele pode representar de 20 a 50% do número total de metanogênicos (KRÜGER *et al.*, 2005), entretanto ele representa somente 4% das arqueas metanogênicas nas turfeiras do Segundo Planalto paranaenses e em outra turfeira do hemisfério norte (CADILLO-QUIROZ *et al.*, 2008). RC-II foi o grupo metanogênico mais abundante, contendo representantes nas amostras PA20, SM20 e CG50 (FIGURA 20). É assumida para esse grupo uma ampla faixa de pH, uma vez que suas sequências já foram encontradas em sítios ácidos e neutros (CHIN *et al.* 1999; BASILIKO *et al.* 2003; KEMNITZ *et al.*, 2004). Infelizmente, nenhum representante do grupo RC-II foi isolado até o momento.

Sequências que agruparam com *Methanoregula spp.* foram obtidas nas amostras SM20 e PA20 (FIGURA 20). Estas sequências são provavelmente de metanogênicas hidrogenotróficas e/ou formatotróficas, uma vez que representantes

deste grupo utilizam H_2/CO_2 (BRAUER *et al.*, 2010) ou H_2/CO_2 e formato (YASHIRO *et al.*, 2011). Esse grupo é abundante em outras turfeiras oligotróficas (GALAND *et al.*, 2005; STEINBERG e REGAN, 2008) e seu crescimento em condição de baixos nutrientes, baixa concentração de íons e sua sensibilidade ao oxigênio (BRÄUER *et al.*, 2006) demonstram sua adaptação a ambientes extremos. Outras prováveis metanogênicas hidrogenotróficas foram ainda observadas nas ordens *Methanomicrobiales* e *Methanocellales*.

Táxons do grupo GOM Arc I (LLOYD *et al.*, 2006), presentes em PA20, CG20 e CG50 (FIGURA 20), mostraram-se filogeneticamente próximos de arqueas não cultivadas de sedimentos e turfeiras no hemisfério norte (CADILLO-QUIROZ *et al.*, 2006; CADILLO-QUIROZ *et al.*, 2008; NUNOURA *et al.*, 2009). Embora esse grupo seja filogeneticamente próximo do grupo ANME-2 (*Archaeal ANaerobic MEthane oxidizers*; LLOYD *et al.*, 2006), não há evidência de oxidação de metano anaeróbico em GOM arc I.

As metanogênicas acetoclásticas que foram observadas somente em PA20 e que representaram apenas 11% do total das metanogênicas são filogeneticamente próximas do gênero *Methanosaeta* (FIGURA 20). A ausência de outras acetotróficas pertencentes à família *Methanosarcinaceae* nesta turfeira sugere baixa concentração de acetato nessa área, uma vez que em ecossistemas em que a concentração de acetato é alta *Methanosaeta* é menos competitiva que *Methanosarcina* (CHIN *et al.*, 2004; FEY e CONRAD, 2000; WEBER *et al.*, 2001).

A predominância de metanogênicas hidrogenotróficas (89% das metanogênicas) sugere que a principal produção de CH_4 ocorre via H_2-CO_2 . Este resultado é consistente com outros estudos que demonstraram que hidrogenotrofia é a reação dominante em turfeiras (CHASAR *et al.*, 2000; HORN *et al.*, 2003; LANSDOWN *et al.*, 1992; GALAND *et al.*, 2005). A dominância do *Sphagnum* nos organossolos dos Campos de Altitude pode explicar em parte a menor população de metanogênicas acetotróficas nessas turfeiras. Turfeiras dominadas por *Sphagnum* têm sido identificadas como áreas onde a redução do CO_2 é um importante caminho para a produção de CH_4 (KELLY *et al.*, 1992). Essas briófitas têm um sistema radicular pequeno e não introduzem qualquer substrato de carbono lábil dentro das camadas de turfeira anaeróbica (GALAND *et al.*, 2005).

Em concordância com o que foi reportado por Aller e Kemp (2008), que compararam a diversidade de *Bacteria* e de *Archaea* em solos, sedimentos, águas

subterrâneas, fontes hidrotermais e biorreatores, os organossolos das turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses também apresentaram maior riqueza de *Bacteria* do que *Archaea* (FIGURA 16b). Com raras exceções, como nos sedimentos marinhos do Golfo do México (LLOYD *et al.*, 2010), a diversidade de *Archaea* foi maior do que a de *Bacteria*. Entretanto uma explicação para essas diferenças parece estar longe de ser obtida com os métodos de amostragem utilizadas até o momento. Especula-se que *Archaea* habite poucos e específicos micronichos dentro de um ecossistema e que *Bacteria* seja capaz de ocupar uma variedade maior de micronichos no mesmo ambiente. Desta forma, ambientes heterogêneos, ou seja, com diferentes micronichos favorecem o predomínio de *Bacteria* (ALLER e KEMP, 2008). A variação na estrutura das comunidades bacterianas dentro de um mesmo organossolo observado na análise de ARDRA (FIGURA 4a) sugere a existência de diferentes micronichos nesse solo e corrobora com a hipótese proposta por Aller e Kemp (2008).

Em ecologia microbiana medidas de riqueza e de diversidade de espécies têm sido amplamente utilizadas para a caracterização dos mais variados tipos de ecossistema. A correlação desses índices com atributos físicos e químicos do solo tem permitido aos pesquisadores identificar os fatores ambientais determinantes para diversidade procariótica. Estudos microbiológicos sugerem que a riqueza e a diversidade de espécies são fortemente influenciadas pelo pH (FIERER e JACKSON, 2006; HARTMAN *et al.*, 2008; JESUS *et al.*, 2009). No presente estudo, ao comparar as amostras coletadas na mesma profundidade (SM20, CG20 e PA20), a riqueza de OTU_{0.03} de *Archaea* e a diversidade procariótica das OTU_{0.03} (FIGURA 22) foram maiores no organossolo com maior valor de pH (TABELA 4). Entretanto essa relação com o pH não é observada ao analisar a riqueza de OTU_{0.03} de *Bacteria*, uma vez que as curvas de rarefação das amostras SM20, CG20 e PA20 praticamente se sobrepuseram, indicando que esses organossolos possuem riquezas similares (FIGURA 6). Faoro e colaboradores, ao estudar a diversidade bacteriana em solos ácidos da Floresta Atlântica, concluíram que em solos onde não há uma grande variação de pH fatores como a altitude Mg^{+2}/Ca^{+2} , P e Al^{+3} podem explicar melhor a diversidade bacteriana. Entretanto tais atributos não foram mensurados nesse trabalho, impossibilitando qualquer tipo de correlação. A menor riqueza de espécies observada na amostra CG50 de ambos os Domínios (FIGURA 6

e 14) pode estar relacionada com o aumento da profundidade e consequente diminuição de O₂, como já discutido anteriormente (FIERER *et al.*, 2003).

As curvas de rarefação mostraram que a riqueza total de *Archaea* e *Bacteria* ainda está muito longe de ser atingida, sugerindo que esses ambientes possuem ainda muita informação microbiológica desconhecida. Dar continuidade a esse estudo microbiológico pioneiro é necessário e urgente, uma vez que as turfeiras dos Campos Gerais e de Palmas já se encontram ameaçadas com o avanço das pastagens e da agricultura. Essas ameaças colocam em risco toda a biodiversidade microbiana, pois mudanças bruscas no solo, como: o aumento do pH, a drenagem e a retirada da cobertura vegetal são necessários para tornar esses organossolos agricultáveis. A atividade antrópica no solo geralmente vem acompanhada por uma diminuição da diversidade bacteriana nativa (BORNEMAN e TRIPLET, 1997; NÜSSLEIN e TIEDJE, 1999). A extinção de uma espécie desconhecida é uma perda imensurável, porque cada espécie possui informações genéticas únicas, moldadas por complexas interações ecológicas ao longo da evolução.

Em síntese, o presente trabalho sugere a existência de uma complexa rede trófica nas turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses, revelando uma elevada diversidade procariótica, com maior riqueza de *Bacteria* do que de *Archaea*. Curiosamente, apesar do fato de as turfeiras serem consideradas os principais ecossistemas emissores de CH₄ do planeta, comunidades metanogênicas não prevaleceram no Domínio *Archaea* e menos de 1% dos clones bacterianos foram classificados como metanotróficos.

7.0 CONCLUSÕES

- As turfeiras dos Campos de Altitude paranaenses apresentaram maior riqueza de *Bacteria* do que de *Archaea*;
- As turfeiras do terceiro planalto (PA20) apresentaram maior diversidade de procariotos;
- A profundidade do organossolo provoca diminuição da riqueza de *Bacteria* e *Archaea*;
- O sequenciamento do gene *SSU rRNA* mostrou a prevalência de *Acidobacteria* e *Proteobacteria* para o Domínio *Bacteria* e MCG e TG para o Domínio *Archaea*;
- Os táxons bacterianos dominantes foram os responsáveis pelas similaridades das bibliotecas, enquanto as espécies pertencentes aos filos de menor ocorrência foram as responsáveis pelas diferenças observadas;
- Os táxons de MCG foram os responsáveis pela similaridade entre as turfeiras da Serra do Mar e do Terceiro Planalto;
- Somente 0,7% das bactérias foram classificadas como metanotróficas;
- O gênero *Ktedonobacter* foi mais abundante em organossolos mais profundos;
- Noventa por cento das sequências do gene *SSU rRNA* de *Archaea* pertenceram ao filo *Crenarchaeota*;
- Oitenta e nove por cento das metanogênicas foram hidrogenotróficas, sugerindo que o principal caminho de produção de metano deve ser via H_2 - CO_2

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, R. A.; ARCHAMBAULT, J.; ROSSELLÓ-MORA, R.; TINDALL, B. J.; MATHENY, M. *Bacillus acidicola* sp. nov., a novel mesophilic, acidophilic species isolated from acidic *Sphagnum* peat bogs in Wisconsin. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n.5, p. 2125-2130, 2005.

ALLER, J. Y.; KEMP, P. F. Are Archaea inherently less diverse than Bacteria in the same environments? **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, n. 1, p. 74–87, 2008.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

ARIESYADY, H. D.; ITO, T.; OKABE, S. Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. **Water Research**, v. 41, n. 7, p. 1554-1568, 2007.

ASHELFORD, K. E.; CHUZHANOVA, N. A.; FRY, J. C.; JONES, A. J.; WEIGHTMAN, A. J. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 7724–7736, 2005.

ASHELFORD, K. E.; CHUZHANOVA, N. A.; FRY, J. C.; JONES, A. J.; WEIGHTMAN, A. J. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 5734–5741, 2006.

BARNS, S. M.; CAIN, E. C.; SOMMERVILLE, L.; KUSKE, C. R. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 3113-3116, 2007.

BASILIKO, N.; YAVITT, J. B.; DEES, P. M.; MERKEL, S. M. Methane Biogeochemistry and Methanogen Communities in Two Northern Peatland Ecosystems, New York State. **Geomicrobiology Journal**, v. 20, n. 6, p. 563–577, 2003.

BEHLING, H. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 177, n. 1-2, p. 19–27, 2002.

BELOVA, S. E.; PANKRATOV, T. A.; DEDYSH, S. N. Bacteria of the genus *Burkholderia* as a typical component of the microbial community of sphagnum peat bogs. **Mikrobiologiya**, v. 75, n. 1, p. 110-117, 2006.

BIDDLE, J. F.; LIPP, J. S.; LEVER, M. A.; LLOYD, K.G.; SØRENSEN, K.B.; ANDERSON, R.; FREDRICKS, H.F.; ELVERT, M.; KELLY, T.J.; SCHRAG, D.P.; SOGIN, M.L.; BRENCHELEY, J.E.; TESKE, A.; HOUSE, C.H.; HINRICH, K.U. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 10, p. 3846-3851, 2006.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N.T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J.D.; RODE, C.K.; MAYHEW, G.F.; GREGOR, J.; DAVIS, N.W.; KIRKPATRICK, H.A.; GOEDEN, M.A.; ROSE, D.J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1453-1462, 1997.

BODZIAK, C. J.; MAACK, R. Contribuição ao conhecimento dos solos dos Campos Gerais no Estado do Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 1, p. 197-214, 2001.

BRÄUER, S. L.; CADILLO-QUIROZ, H.; YASHIRO, E.; YAVITT, J. B.; ZINDER, S. H. Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog. **Nature**, v. 442, n. 7099, p. 192-194, 2006.

BRÄUER, S.; CADILLO-QUIROZ, H.; WARD, R. J.; YAVITT, J.; ZINDER, S. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 61, p. 45-52, 2010.

BROSIUS, J.; DULL, T. J.; SLEETER, D. D.; NOLLER, H. F. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 148, n. 2, p. 107-127, 1981.

BROSIUS, J.; PALMER, M. L.; KENNEDY, P. J.; NOLLER, H. F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 10, p. 4801-4805, 1978.

BRUCE, T.; MARTINEZ, I. B.; MAIA NETO, O.; VICENTE, A.C.; KRUGER, R.H.; THOMPSON, F.L. Bacterial Community Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Soils. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 4, p. 840-849, 2010.

BUCKLEY, T. R.; SIMON, C.; CHAMBERS, G. K. Exploring among-site rate variation models in a maximum likelihood framework using empirical data: effects of model

assumptions on estimates of topology, branch lengths, and bootstrap support. **Systematic Biology**, v. 50, n. 1, p. 67-86, 2001.

BUCKLEY, THOMAS R. Model misspecification and probabilistic tests of topology: evidence from empirical data sets. **Systematic Biology**, v. 51, n. 3, p. 509-523, 2002.

BUCKLEY, T. R.; CUNNINGHAM, C. W. The effects of nucleotide substitution model assumptions on estimates of nonparametric bootstrap support. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 4, p. 394-405, 2002.

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009.

CADILLO-QUIROZ, H.; BRAUER, S.; YASHIRO, E.; SUN, C.; YAVITT, J.; ZINDER, S. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 1428-1440, 2006.

CADILLO-QUIROZ, H.; YASHIRO, E.; YAVITT, J. B.; ZINDER, S. H. Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2059-2068, 2008.

CADILLO-QUIROZ, H.; YAVITT, J. B.; ZINDER, S. H.; THIES, J. E. Diversity and community structure of Archaea inhabiting the rhizoplane of two contrasting plants from an acidic bog. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 4, p. 757-767, 2010.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 4, p. 540-552, 2000.

CAVALETTI, L.; MONCIARDINI, P.; BAMONTE, R.; SCHUMANN, P.; ROHDE, M.; SOSIO, M.; DONADIO, S. New lineage of filamentous, spore-forming, gram-positive bacteria from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4360-4369, 2006.

CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 330-339, 2007.

CHASAR, L. S.; CHANTON, J. P.; GLASER, P. H.; SIEGEL, D. I.; RIVERS, J. S. Radiocarbon and stable carbon isotopic evidence for transport and transformation of dissolved organic carbon, dissolved inorganic carbon, and CH₄ in a northern

Minnesota peatland. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 14, n. 4, p. 1095–1108, 2000.

CHIN, K. J.; LUKOW, T.; CONRAD, R. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2341–2349, 1999.

CHIN, K. J.; LUEDERS, T.; FRIEDRICH, M. W.; KLOSE, M.; CONRAD, R. Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. **Microbial Ecology**, v. 47, n. 1, p. 59–67, 2004.

COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p.141–145, 2009.

DAMS, E.; HENDRIKS, L.; VAN DE PEER, Y.; NEEFS, J.M.; SMITS, G.; VANDENBEMPT, I.; WACHTER, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 16 Suppl, p. r87-173, 1988.

DANIELS, R.; EDDY, A. **Handbook of European Sphagna**. Abbots Ripton Huntingdon, Cambridgeshire, UK: Institute of Terrestrial Ecology, Natural Environment Research Council, 1985.

DANNENBERG, S.; CONRAD, RALF. Effect of rice plants on methane production and rhizospheric metabolism in paddy soil. **Biogeochemistry**, v. 45, n. 1, p. 53–71, 1999.

DEDYSH, S N; DERAQSHANI, M.; LIESACK, W. Detection and enumeration of methanotrophs in acidic *Sphagnum* peat by 16S rRNA fluorescence in situ hybridization, including the use of newly developed oligonucleotide probes for *Methylocella palustris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4850-4857, 2001.

DEDYSH, S N; LIESACK, W; KHMELLENINA, V N; SUZINA, N.E.; TROTSSENKO, Y.A.; SEMRAU, J.D.; BARES, A.M.; PANIKOV, N.S.; TIEDJE, J.M. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 955-969, 2000.

DEDYSH, S N; PANIKOV, N S; LIESACK, W; GROSSKOPF, R.; ZHOU, J.; TIEDJE, J.M. Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. **Science**, v. 282, n. 5387, p. 281-284, 1998a.

DEDYSH, S. N.; PANIKOV, N. S.; TIEDJE, J. M. Acidophilic methanotrophic communities from Sphagnum peat bogs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 922-929, 1998b.

DEDYSH, S. N.; BELOVA, S. E.; BODELIER, P. L. E.; SMIRNOVA, K. V.; KHMELENINA, V. N.; CHIDTHAISONG, A.; TROTSSENKO, Y. A.; LIESACK, W.; DUNFIELD, P. F. *Methylocystis heyeri* sp. nov., a novel type II methanotrophic bacterium possessing "signature" fatty acids of type I methanotrophs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 472-479, 2007.

DEDYSH, S. N.; KHMELENINA, V. N.; SUZINA, N. E.; TROTSSENKO, Y.A.; SEMRAU, J.D.; LIESACK, W.; TIEDJE, J.M. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from *Sphagnum* bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 251-261, 2002.

DEDYSH, S. N.; PANKRATOV, T. A.; BELOVA, S. E.; KULICHEVSKAYA, I. S.; LIESACK, W. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria community composition in an acidic *Sphagnum* peat bog. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 2110-2117, 2006.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E.L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G.L. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DOROSHENKO, E. V.; BULYGINA, E. S.; SPIRIDONOVA, E. M.; TUROVA, T. P.; KRAVCHENKO, I. K. Isolation and characterization of nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azospirillum* from the soil of a *Sphagnum* peat bog. **Mikrobiologiya**, v. 76, n. 1, p. 107-115, 2007.

DUNBAR, J.; TICKNOR, L. O.; KUSKE, C. R. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2943-2950, 2000.

EICHORST, S. A.; BREZNAK, J. A.; SCHMIDT, T. M. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum Acidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2708-2717, 2007.

EICHORST, S. A.; KUSKE, C. R.; SCHMIDT, T. M. Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum Acidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 586-596, 2011.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, 1999.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

FAORO, H. **Determinação da biodiversidade de Archaea e Bacteria da Mata Atlântica paranaense**. 171f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FAORO, H.; ALVES, A. C.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; CRUZ, L. M.; AL-JANABI, S.M.; MONTEIRO, R. A.; BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4744–4749, 2010.

FEY, A.; CONRAD, R. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4790–4797, 2000.

FIERER, N.; SCHIMEL, J. P.; HOLDEN, P. A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 167–176, 2003.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 3, p. 626–631, 2006.

FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN, C. J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 210–220, 2004.

FOX, G. E.; PECHMAN, K. R.; WOESE, C. R. Comparative Cataloging of 16S Ribosomal Ribonucleic Acid: Molecular Approach to Procaryotic Systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 27, n. 1, p. 44–57, 1977.

GALAND, P. E.; FRITZE, H.; CONRAD, R.; YRJÄLÄ, K. Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic archaea in three boreal peatland ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 2195–2198, 2005.

GALAND, P. E.; SAARNIO, S.; FRITZE, H.; YRJÄLÄ, K. Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, n. 3, p. 441–449, 2002.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, v. 309, n. 5739, p. 1387–1390, 2005.

GARRITY, G. M. LILBURN, T. G. COLE, J. R. The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. **TOBA Release 7.7**, 2007.

GIOVANNONI, S. J.; DELONG, E. F.; OLSEN, G. J.; PACE, N. R. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 2, p. 720-726, 1988.

GODON, J. J.; MORINIÈRE, J.; MOLETTA, M.; GAILLAC, M.; BRU, V. DELGÈNES, J. P. Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: the "Synergistes" example. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 213-224, 2005.

GOLDMAN, N. Phylogenetic information and experimental design in molecular systematics. **Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society**, v. 265, n. 1407, p. 1779-1786, 1998.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GORHAM, E. Northern Peatlands: Role in the Carbon Cycle and Probable Responses to Climatic Warming. **Ecological Applications**, v. 1, n. 2, p. 182, 1991.

GUTKNECHT, J. L. M.; GOODMAN, R. M.; BALSER, T. C. Linking soil process and microbial ecology in freshwater wetland ecosystems. **Plant and Soil**, v. 289, n. 1-2, p. 17-34, 2006.

HAACK, S. K.; FOGARTY, L. R.; WEST, T. G.; ALM, E. W.; MCGUIRE, J. T.; LONG, D. T.; HYNDMAN, D. W.; FORNEY, L. J. Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 438-448, 2004.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 439-471, 1996.

HARRIS, J. K.; KELLEY, S. T.; PACE, N. R. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 845-849, 2004.

HARTMAN, W. H.; RICHARDSON, CURTIS J; VILGALYS, R.; BRULAND, G. L. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 46, p. 17842-17847, 2008.

HILLIS, D. **Molecular systematics**. 2º ed. Sunderland Mass.: Sinauer Associates, 1996.

HOJ, L.; OLSEN, R. A.; TORSVIK, V. L. Archaeal communities in High Arctic wetlands at Spitsbergen, Norway (78 degrees N) as characterized by 16S rRNA gene fingerprinting. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, n. 1, p. 89-101, 2005.

HOLMES, A. J.; COSTELLO, A.; LIDSTROM, M. E.; MURRELL, J. C. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, n. 3, p. 203-208, 1995.

HORN, M. A.; MATTHIES, C.; KÜSEL, K. SCHRAMM, A.; DRAKE, H. L. Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acidic peat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 74-83, 2003.

HORZ, H. P.; YIMGA, M. T.; LIESACK, W. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4177-4185, 2001.

HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v. 20, n. 14, p. 2317-2319, 2004.

HUGHES, J. B.; HELLMANN, J. J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN, B. J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4399-4406, 2001.

JACKSON, C. R.; RODEN, E. E.; CHURCHILL, P. F. Changes in bacterial species composition in enrichment cultures with various dilutions of inoculum as monitored by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 5046-5048, 1998.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009.

JUOTTONEN, H.; TUUTTILA, E. S.; JUUTINEN, S.; FRITZE, H.; YRJÄLÄ, K. Seasonality of rDNA- and rRNA-derived archaeal communities and methanogenic potential in a boreal mire. **The ISME Journal**, v. 2, n. 11, p. 1157-1168, 2008.

KELLY, C. A.; DISE, N. B.; MARTENS, C. S. Temporal variations in the stable carbon isotopic composition of methane emitted from Minnesota peatlands. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 6, n. 3, p. 263, 1992.

KELSEY, C. R.; CRANDALL, K. A.; VOEVODIN, A. F. Different models, different trees: the geographic origin of PTLV-I. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 13, n. 2, p. 336-347, 1999.

KEMNITZ, D.; CHIN, K. J.; BODELIER, P.; CONRAD, R. Community analysis of methanogenic archaea within a riparian flooding gradient. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 449-461, 2004.

KIELAK, A.; PIJL, A. S.; VEEN, J. A. V.; KOWALCHUK, G. A. Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 3, p. 372-382, 2008.

KINDT, R.; COE, R. **Tree Diversity Analysis. A Manual and Software for Common Statistical Methods and Biodiversity Studies**. World Agroforestry Centre. (ICRAF): Nairobi., 2005.

KIRCHMAN, D. L. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, n. 2, p. 91-100, 2002.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.

KOPCZYNSKI, E. D.; BATESON, M. M.; WARD, D. M. Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 746-748, 1994.

KOTSYURBENKO, O. R.; CHIN, K. J.; GLAGOLEV, M. V.; STUBNER, S.; SIMANKOVA, M. V.; NOZHEVNIKOVA, A. N.; CONRAD, R. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1159-1173, 2004.

KREADER, C. A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1102-1106, 1996.

KREMER, C.; PETTOLINO, F.; BACIC, A.; DRINNAN, A. Distribution of cell wall components in Sphagnum hyaline cells and in liverwort and hornwort elaters. **Planta**, v. 219, n. 6, p. 1023-1035, 2004.

KRÜGER, M.; FRENZEL, P.; KEMNITZ, D.; CONRAD, R. Activity, structure and dynamics of the methanogenic archaeal community in a flooded Italian rice field. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 3, p. 323–331, 2005.

KULICHEVSKAYA, I. S.; PANKRATOV, T. A.; DEDYSH, S. N. Detection of representatives of the *Planctomycetes* in Sphagnum peat bogs by molecular and cultivation methods. **Mikrobiologiya**, v. 75, n. 3, p. 389–396, 2006.

KULICHEVSKAYA, I. S.; BAULINA, O. I.; BODELIER, P. L. E.; RIJPSTRA, W. I.; DAMSTÉ, J. S.; DEDYSH, S. N. *Zavarzinella formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, Gemmata-like planctomycete from a Siberian peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. Pt 2, p. 357–364, 2009.

KULICHEVSKAYA, I. S.; GUZEV, V. S.; GORLENKO, V. M.; LIESACK, W.; DEDYSH, S. N. *Rhodoblastus sphagnicola* sp. nov., a novel acidophilic purple non-sulfur bacterium from *Sphagnum* peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. Pt 6, p. 1397–1402, 2006.

KULICHEVSKAYA, I. S.; SUZINA, N. E.; LIESACK, W.; DEDYSH, S. N. *Bryobacter aggregatus* gen. nov., sp. nov., a peat-inhabiting, aerobic chemo-organotroph from subdivision 3 of the Acidobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. Pt 2, p. 301–306, 2010.

LAKE, J. A. The order of sequence alignment can bias the selection of tree topology. **Molecular Biology and Evolution**, v. 8, n. 3, p. 378–385, 1991.

LANSDOWN, J.; QUAY, P.; KING, S. CH₄ production via CO₂ reduction in a temperate bog: A source of ¹³C-depleted CH₄. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 56, n. 9, p. 3493–3503, 1992.

LARMOLA, T.; TUUTTILA, E. S.; TIIROLA, M.; NYKÄNEN, H.; MARTIKAINEN, P. J.; YRJÄLÄ, K.; TUOMIVIRTA, T.; FRITZE, H. The role of Sphagnum mosses in the methane cycling of a boreal mire. **Ecology**, v. 91, n. 8, p. 2356–2365, 2010.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. 2^o ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LIESACK, W.; WEYLAND, H.; STACKEBRANDT, E. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. **Microbial Ecology**, v. 21, n. 1, p. 191–198, 1991.

LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes

encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4516-4522, 1997.

LIU, Z.; LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; BUSHMAN, F. D.; KNIGHT, R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 18, p. e120, 2007.

LLOYD, K. G. LAPHAM, L.; TESKE, A. An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7218-7230, 2006.

LOREAU, M.; NAEEM, S. INCHAUSTI, P.; BENGTSSON, J.; GRIME, J. P.; HECTOR, A.; HOOPER, D. U.; HUSTON, M. A.; RAFFAELLI, D.; SCHMID, B.; TILMAN, D.; WARDLE, D. A. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 804-808, 2001.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228-8235, 2005.

LUDWIG, W; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2-3, p. 155-173, 1994.

LUDWIG, W; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 3, 2008.

LUTON, P. E.; WAYNE, J. M.; SHARP, R. J.; RILEY, P. W. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. 11, p. 3521-3530, 2002.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. Curitiba, PR.: BADEP/UFPR/IBPT, 1968.

MACDONALD, G. M.; BEILMAN, D. W.; KREMENETSKI, K. V.; SHENG, Y.; SMITH, L. C.; VELICHKO, A. A. Rapid early development of circumarctic peatlands and atmospheric CH₄ and CO₂ variations. **Science**, v. 314, n. 5797, p. 285-288, 2006.

MAGURRAN, A. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton N.J.: Princeton University Press, 1988.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. **Environment International**, v. 34, n. 2, p. 265-276, 2008.

MARKHAM, A.; DUDLEY, N.; STOLTON, S. **Some like it hot : climate change, biodiversity, and the survival of species**. Gland Switzerland: WWF International, 1993.

MENDES, L. W. **Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP**. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MORO, R. S.; ROCHA, C. H.; TAKEDA, I. J. M.; KACZMARECH, R. Análise da vegetação nativa da bacia do rio São Jorge. **Publicatio UEPG**, v. 2, p. 33-56, 1996.

MORRIS, S. A.; RADAJEWSKI, S.; WILLISON, T. W.; MURRELL, J. C. Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1446-1453, 2002.

MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of apicomplexa. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 4, p. 428-441, 1997.

MOYER, C. L.; TIEDJE, J. M.; DOBBS, F. C.; KARL, D. M. Diversity of deep-sea hydrothermal vent Archaea from Loihi Seamount, Hawaii. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 45, n. 3, p. 303–317, 1998.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 1, p. 127-141, 1998.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655-670, 2003.

NARIHIRO, T.; TERADA, T.; KIKUCHI, K.; IGUCHI, A.; IKEDA, M.; YAMAUCHI, T.; SHIRAISHI, K.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K.; SEKIGUCHI, Y. Comparative analysis of bacterial and archaeal communities in methanogenic sludge granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors treating various food-processing, high-

strength organic wastewaters. **Microbes and Environments / JSME**, v. 24, n. 2, p. 88-96, 2009.

NAWROCKI, E. P.; KOLBE, D. L.; EDDY, S. R. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. **Bioinformatics**, v. 25, n. 10, p. 1335-1337, 2009.

NÜSSLEIN, K.; TIEDJE, J. M. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3622-3626, 1999.

NUNOURA, T.; SOFFIENTINO, B.; BLAZEJAK, A.; KAKUTA, J.; OIDA, H.; SCHIPPERS, A.; TAKAI, K. Subseafloor microbial communities associated with rapid turbidite deposition in the Gulf of Mexico continental slope (IODP Expedition 308). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, n. 3, p. 410-424, 2009.

O'DONNELL, A. G.; GORRES, H. E. 16S rDNA methods in soil microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 225-229, 1999.

OGRAM, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11-12, p. 1499-1504, 2000.

OKSANEN, J.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; O'HARA, R. B. **Vegan: Community Ecology Package version 1.8-6**. 2007.

OLINE, D. K.; SCHMIDT, S. K.; GRANT, M. C. Biogeography and landscape-scale diversity of the dominant Crenarchaeota of soil. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 3, p. 480-490, 2006.

OLSEN, G. J.; LANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R.; STAHL, D. A. Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 337-365, 1986.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB Journal**, v. 7, n. 1, p. 113-123, 1993.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 1, p. 1-6, 1994.

PAABO, S.; IRWIN, D. M.; WILSON, A. C. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 8, p. 4718-4721, 1990.

PACE, N R; STAHL, D. A. LANE, D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, v. 9, p. 1-55, 1986.

PANKRATOV, T. A.; DEDYSH, S. N. *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *Granulicella pectinivorans* sp. nov., *Granulicella aggregans* sp. nov. and *Granulicella rosea* sp. nov., acidophilic, polymer-degrading acidobacteria from *Sphagnum* peat bogs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 2951-2959, 2010.

PANKRATOV, T, A; KULICHEVSKAYA, I. S.; LIESACK, W.; DEDYSH, S. N. Isolation of aerobic, gliding, xylanolytic and laminarinolytic bacteria from acidic *Sphagnum* peatlands and emended description of *Chitinophaga arvensicola* Kampfer *et al.* 2006. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. Pt 12, p. 2761-2764, 2006.

PANKRATOV, T. A; TINDALL, B. J.; LIESACK, W.; DEDYSH, S. N. *Mucilaginibacter paludis* gen. nov., sp. nov. and *Mucilaginibacter gracilis* sp. nov., pectin-, xylan- and laminarin-degrading members of the family Sphingobacteriaceae from acidic *Sphagnum* peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. Pt 10, p. 2349-2354, 2007.

PANKRATOV, T. A.; IVANOVA, A. O.; DEDYSH, S. N.; LIESACK, W. Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic *Sphagnum* peat. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1800-1814, 2011.

PANKRATOV, T. A; KIRSANOVA, L. A.; KAPARULLINA, E. N.; KEVBRIN, V. V.; DEDYSH, S. N. *Telmatobacter bradus* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the Acidobacteria and emended description of *Acidobacterium capsulatum* Kishimoto *et al.* 1991. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2011.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 856-866, 2009.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B. M.; LUDWIG, W.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked

and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 21, p. 7188–7196, 2007.

PUPKO, T.; HUCHON, D.; CAO, Y.; OKADA, N.; HASEGAWA, M. Combining multiple data sets in a likelihood analysis: which models are the best? **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 12, p. 2294-2307, 2002.

RAGHOEBARSING, A. A.; SMOLDERS, A. J. P.; SCHMID, M. C.; RIJPSTRA, W. I.; WOLTERS-ARTS, M.; DERKSEN, J.; JETTEN, M. S.; SCHOUTEN, S.; SINNINGHE-DAMSTÉ, J. S.; LAMERS, L.P.; ROELOFS, J. G.; OP DEN CAMP, H. J.; STROUS, M. Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1153-1156, 2005.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, STEPHEN J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 369-394, 2003.

RICHARDSON, C J; TILTON, D. L.; KADLEC, J. A. Nutrient dynamics of northern wetland ecosystems. **Freshwater Wetlands – Ecological Processes and Management Potential**. New York, NY, USA: Academic Press. p.217–241, 1978.

RIELEY, J. O.; WÜST, R. A. J.; JAUHAINEN, J.; PAGE, S. E.; WOSTEN, H.; HOOIJER, A.; SIEGERT, F.; LIMIM, S. H.; VASANDER, H.; STAHLHUT, M. **Peatlands and climate change - Tropical Peatlands: Carbon stores, carbon gas emissions and contribution to climate change processes**. Peat Society, Calgary. p. 44-70, 2008.

ROBERTS, D. W. **labdsv: Laboratory for Dynamic Synthetic Vegephenomenology**. R package version 1.2-2. 2006.

RODERJAN, C. V.; GALVÃO, F.; KUNIYOSHI, Y. S.; HATSCHBACH, G. G. As Unidades Fitogeográficas do Estado do Paraná, Brasil. **Revista & Ambiente**, v. 24, p. 75-92, 2002.

ROSSELLÓ-MORA, R; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

RUDOLPH, H.; SAMLAND, J. Occurrence and metabolism of sphagnum acid in the cell walls of bryophytes. **Phytochemistry**, v. 24, n. 4, p. 745-749, 1985.

SAFFORD, H. D. Brazilian Paramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. **Journal of Biogeography**, v. 26, n. 4, p. 693–712, 1999.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SAKAI, S.; IMACHI, H.; SEKIGUCHI, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: a novel isolate affiliated with the clone cluster rice cluster I. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4326-4331, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 2º ed. Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANGWAN, P.; CHEN, X.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, Spartobacteria classis nov., of the phylum Verrucomicrobia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5875-5881, 2004.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6773-6779, 2006.

SCHLOSS, P. D.; LARGET, B. R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5485-5492, 2004.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHMALENBERGER, A.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3557-3563, 2001.

SCHNEEGURT, M. A.; DORE, S. Y.; KULPA, C. F. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2003.

SCHWARZENBACH, K.; ENKERLI, J.; WIDMER, F. Objective criteria to assess representativity of soil fungal community profiles. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 2, p. 358-366, 2007.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4870-4876, 1998.

SEKIGUCHI, Y. Yet-to-be Cultured Microorganisms Relevant to Methane Fermentation Processes. **Microbes and Environments**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2006.

SHAW, P. **Multivariate statistics for the environmental sciences**. London□;New York: Distributed in the United States by Oxford University Press, 2003.

SIZOVA, M. V.; PANIKOV, N. S.; TOUROVA, T. P.; FLANAGAN, P. W. Isolation and characterization of oligotrophic acido-tolerant methanogenic consortia from a Sphagnum peat bog. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n. 3, p. 301-315, 2003.

SLIWINSKI, M. K.; GOODMAN, R. M. Comparison of crenarchaeal consortia inhabiting the rhizosphere of diverse terrestrial plants with those in bulk soil in native environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1821–1826, 2004.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; VAN DEN BROEK J.; VAN MIL, S.; WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2284–2291, 2001.

SPIEGELMAN, D.; WHISSELL, G.; GREER, C. W. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 355-386, 2005.

STALHEIM, T.; BALLANCE, S.; CHRISTENSEN, B. E.; GRANUM, P. E. Sphagnum - a pectin-like polymer isolated from *Sphagnum* moss can inhibit the growth of some typical food spoilage and food poisoning bacteria by lowering the pH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 967-976, 2009.

STEINBERG, L. M.; REGAN, J. M. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6663–6671, 2008.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 625–630, 1996.

SUZUKI, Y. GLAZKO, G. V.; NEI, M. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16138-16143, 2002.

SWOFFORD, D. **PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Version 4**. Sunderland, Mass. Sinauer Associates, 2000.

TAKAI, K.; MOSER, D. P.; DEFLAUN, M.; ONSTOTT, T. C.; FREDRICKSON, J. K. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5750-5760, 2001.

TAKEDA, A. K.; TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. Unidades de conservação na região dos Campos Gerais, Paraná. **Publicatio UEPG**, v. 7, p. 57-78, 2001.

TAMURA, K. Model selection in the estimation of the number of nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 154-157, 1994.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596–1599, 2007.

TESKE, A. Microbial Communities of Deep Marine Subsurface Sediments: Molecular and Cultivation Surveys. **Geomicrobiology Journal**, v. 23, n. 6, p. 357–368, 2006.

THERON, J.; CLOETE, T. E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 37-57, 2000.

TIMOTHY, C. Microbial Biodiversity: Saving Bacteria to Save Ourselves. **Harvard Science Review**, p. 26-28, 2002.

TORSVIK, V. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 15-21, 1980.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

TRINGE, S. G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews. Genetics**, v. 6, n. 11, p. 805-814, 2005.

VALLADARES, G. S. **Caracterização de Organossolos, auxílio à sua classificação**. 2003. Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

VANDAMME, P.; OPELT, K.; KNÖCHEL, N.; BERG, C.; SCHÖNMANN, S.; DE BRANDT, E.; EBERL, L.; FALSEN, E.; BERG, G. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2228-2235, 2007.

VARGAS, M. A. T.; HUMGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997.

WADDELL, P. J.; STEEL, M. A. General time-reversible distances with unequal rates across sites: mixing gamma and inverse Gaussian distributions with invariant sites. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 8, n. 3, p. 398-414, 1997.

WANG, G. C.; WANG, Y. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. **Microbiology**, v. 142, n. 5, p. 1107-1114, 1996.

WANG, G. C.; WANG, Y. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4645-4650, 1997.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 345, n. 6270, p. 63-65, 1990.

WARD, N. L.; CHALLACOMBE, J. F.; JANSSEN, P. H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D. H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R. D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T. S.; BRINKAC, L. M.; BRUCE, D.; CREASY, T.; DAUGHERTY, S. C.; DAVIDSEN, T. M.; DEBOY, R. T.; DETTER, J. C.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C. S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S. P.; MADUPU, R.; NELSON, K. E.; NELSON, W. C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROSOVITZ, M. J.; SELENGUT, J. D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S. A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L. S.; WATKINS, K. L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C. R. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WATTS, J. E.; WU, Q.; SCHREIER, S. B.; MAY, H. D.; SOWERS, K. R. Comparative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 710-719, 2001.

WEBER, S. Methanogenic populations involved in the degradation of rice straw in anoxic paddy soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 38, n. 1, p. 11–20, 2001.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. Phylogenetic relationships among the Cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, p. 487-493, 2001.

WINTZINGERODE, F. V.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 213-229, 1997.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOESE, C. R.; GUTELL, R.; GUPTA, R.; NOLLER, H. F. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. **Microbiological Reviews**, v. 47, n. 4, p. 621-669, 1983.

XIE, G.; BRUCE, D. C.; CHALLACOMBE, J. F.; CHERTKOV, O.; DETTER, J. C.; GILNA, P.; HAN, C. S.; LUCAS, S.; MISRA, M.; MYERS, G. L.; RICHARDSON, P.; TAPIA, R.; THAYER, N.; THOMPSON, L. S.; BRETTIN, T. S.; HENRISSAT, B.; WILSON, D. B.; MCBRIDE, M. J. Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 11, p. 3536-3546, 2007.

YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y. Cultivation of uncultured chloroflexi subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured chloroflexi “subphylum i” with natural and biotechnological relevance. **Microbes and Environments**, v. 24, n. 3, p. 205-216, 2009.

YANG, Z. On the best evolutionary rate for phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, v. 47, n. 1, p. 125-133, 1998.

YAP, I. V.; NELSON, R. J. **Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms**. IRRI Discussion Paper Series No. 14. International Rice Research Institute, Manila, 1996.

ZHANG, J. Performance of likelihood ratio tests of evolutionary hypotheses under inadequate substitution models. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 6, p. 868-875, 1999.

ZILLER, S. R. **A estepe gramíneo-lenhosa no Segundo Planalto do Paraná: diagnóstico ambiental com enfoque à contaminação biológica**. 268f. Tese

(Doutorado em Engenharia Florestal) – Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

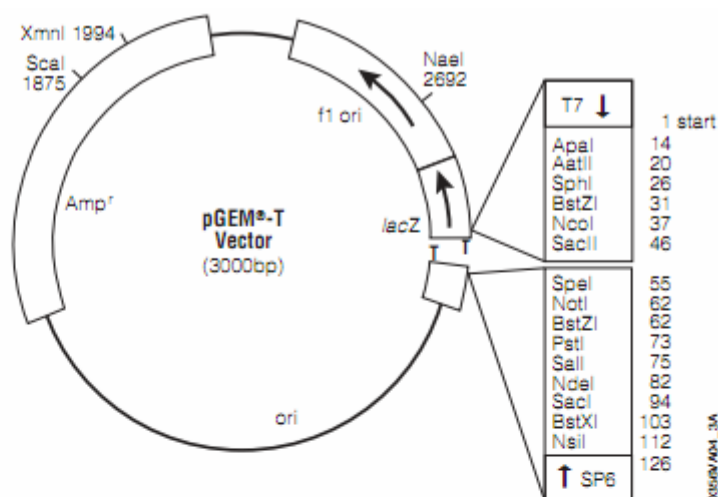
APÊNDICES

APÊNDICE 1 -	ESTRATÉGIA DE EXTRAÇÃO DE ORGANOSSOLO.....	108
APÊNDICE 2 -	MAPA DO VETOR pGEM-T USADO NAS CLONAGENS DOS GENES <i>SSU rRNA</i>	109
APÊNDICE 3 -	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> DOMÍNIO <i>BACTERIA</i>	110
APÊNDICE 4 -	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>SSU rRNA</i> DOMÍNIO <i>ARCHAEA</i>	131
APÊNDICE 5 -	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NO CICLO DO CARBONO.....	151

APÊNDICE 1 - ESTRATÉGIA DE EXTRAÇÃO DE ORGANOSSOLO



Coletor de solo projetado especialmente para esse estudo (A). Posicionando o (B), perfurando (C) e extraíndo uma amostra de solo simples (D). Coluna de organossolo extraída com o coletor (E). Os organossolos amostrados nas imagens não foram utilizados no presente estudo porque não se encontraram abaixo do nível da tábua d'água.

APÊNDICE 2 - MAPA DO VETOR pGEM-T USADO NAS CLONAGENS DOS GENES *SSU rRNA***pGEM®-T Vector sequence reference points:**

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-113
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161-177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185-201
β -lactamase coding region	1322-2182
phage f1 region	2365-2820
<i>lac</i> operon sequences	2821-2981, 151-380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941-2957
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2984-3

APÊNDICE 3 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS SEQUÊNCIAS DO GENE *SSU rRNA*
DOMÍNIO *BACTERIA*

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
1	SM20	2s16Sf1H02	HQ614493	<i>Proteobacteria</i>	91%	<i>Deltaproteobacteria</i>	83%
2	SM20	2s16Sf1H03	HQ614494	<i>Bacteroidetes</i>	100%	<i>Sphingobacteriaceae</i>	100%
3	SM20	2s16Sf1G10	HQ614495	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Gammaproteobacteria</i>	86%
4	SM20	2s16Sf1G11	HQ614496	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Burkholderiales</i>	88%
5	SM20	2s16Sf1G08	HQ614497	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Geothrix</i>	99%
6	SM20	2s16Sf1G09	HQ614498	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
7	SM20	2s16Sf1A04	HQ614499	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Acidocella</i>	100%
8	SM20	2s16Sf1G06	HQ614500	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Acetivibrio</i>	100%
9	SM20	2s16Sf1A03	HQ614501	<i>Acidobacteria</i>	15%	-	-
10	SM20	2s16Sf1G07	HQ614502	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Betaproteobacteria</i>	99%
11	SM20	2s16Sf1G01	HQ614503	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
12	SM20	2s16Sf1A07	HQ614504	<i>Firmicutes</i>	88%	<i>Clostridia</i>	88%
13	SM20	2s16Sf1A05	HQ614505	<i>Proteobacteria</i>	73%	-	-
14	SM20	2s16Sf1G02	HQ614506	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Burkholderiales</i>	100%
15	SM20	2s16Sf1A09	HQ614507	<i>Fibrobacteres</i>	100%	<i>Fibrobacter</i>	100%
16	SM20	2s16Sf1A08	HQ614508	<i>Actinobacteria</i>	100%	<i>Acidimicrobiales</i>	96%
17	SM20	2s16Sf1A11	HQ614509	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
18	SM20	2s16Sf1A10	HQ614510	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
19	SM20	2s16Sf1A12	HQ614511	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Rhodospirillales</i>	89%
20	SM20	2s16Sf1B01	HQ614512	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Gammaproteobacteria</i>	80%
21	SM20	2s16Sf1B02	HQ614513	<i>Firmicutes</i>	68%	-	-
22	SM20	2s16Sf1B07	HQ614514	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
23	SM20	2s16Sf1B06	HQ614515	<i>Firmicutes</i>	25%	-	-
24	SM20	2s16Sf1B05	HQ614516	<i>Verrucomicrobia</i>	10%	-	-
25	SM20	2s16Sf1B04	HQ614517	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Clostridiaceae</i>	93%
26	SM20	2s16Sf1B10	HQ614518	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
27	SM20	2s16Sf1B09	HQ614519	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
28	SM20	2s16Sf1B08	HQ614520	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
29	SM20	2s16Sf1C03	HQ614521	<i>Actinobacteria</i>	85%	<i>Actinobacteria</i>	85%
30	SM20	2s16Sf1C05	HQ614522	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
31	SM20	2s16Sf1B11	HQ614523	<i>Actinobacteria</i>	100%	<i>Acidimicrobinae</i>	85%
32	SM20	2s16Sf1C02	HQ614524	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Geothrix</i>	100%
33	SM20	2s16Sf2H08	HQ614525	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Clostridiales</i>	100%
34	SM20	2s16Sf2H09	HQ614526	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
35	SM20	2s16Sf2H10	HQ614527	<i>Lentisphaerae</i>	25%	-	-
36	SM20	2s16Sf2H11	HQ614528	<i>Proteobacteria</i>	74%	-	-
37	SM20	2s16Sf2H06	HQ614529	<i>Acidobacteria</i>	94%	Gp1	94%
38	SM20	2s16Sf2H05	HQ614530	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
39	SM20	2s16Sf2G12	HQ614531	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
40	SM20	2s16Sf2F12	HQ614532	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
41	SM20	2s16Sf2G03	HQ614533	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Anaerovorax</i>	100%
42	SM20	2s16Sf2F10	HQ614534	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
43	SM20	2s16Sf2F11	HQ614535	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Alphaproteobacteria</i>	86%
44	SM20	2s16Sf2G09	HQ614536	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Acetivibrio</i>	98%
45	SM20	2s16Sf2G10	HQ614537	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Acetivibrio</i>	100%
46	SM20	2s16Sf2G05	HQ614538	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Gammaproteobacteria</i>	99%
47	SM20	2s16Sf2G07	HQ614539	<i>Firmicutes</i>	98%	<i>Ruminococcaceae</i>	96%
48	SM20	2s16Sf1F06	HQ614540	<i>Firmicutes</i>	71%	-	-
49	SM20	2s16Sf2F04	HQ614541	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Burkholderiales</i>	93%
50	SM20	2s16Sf1F07	HQ614542	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Propionivibrio</i>	92%
51	SM20	2s16Sf2F03	HQ614543	<i>Proteobacteria</i>	78%	-	-
52	SM20	2s16Sf1F10	HQ614544	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	99%
53	SM20	2s16Sf2F01	HQ614545	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Geobacter</i>	90%
54	SM20	2s16Sf1F12	HQ614546	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Sorangineae</i>	86%
55	SM20	2s16Sf2E10	HQ614547	<i>Proteobacteria</i>	59%	-	-

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
56	SM20	2s16Sf2E09	HQ614548	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
57	SM20	2s16Sf2E08	HQ614549	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
58	SM20	2s16Sf2E05	HQ614550	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Polaromonas</i>	100%
59	SM20	2s16Sf2E04	HQ614551	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Geothrix</i>	100%
60	SM20	2s16Sf2F07	HQ614552	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
61	SM20	2s16Sf2F05	HQ614553	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
62	SM20	2s16Sf2F08	HQ614554	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	98%
63	SM20	2s16Sf2D04	HQ614555	<i>Firmicutes</i>	83%	-	-
64	SM20	2s16Sf2C11	HQ614556	<i>Acidobacteria</i>	99%	Gp1	98%
65	SM20	2s16Sf2D12	HQ614557	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
66	SM20	2s16Sf2D11	HQ614558	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
67	SM20	2s16Sf2C08	HQ614559	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Geobacter</i>	98%
68	SM20	2s16Sf2C10	HQ614560	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	98%
69	SM20	2s16Sf2C09	HQ614561	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Enterobacteriaceae</i>	100%
70	SM20	2s16Sf2E02	HQ614562	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
71	SM20	2s16Sf2E01	HQ614563	<i>Bacteroidetes</i>	100%	<i>Chitinophagaceae</i>	88%
72	SM20	2s16Sf2E03	HQ614564	<i>Bacteroidetes</i>	100%	<i>Flavobacteriaceae</i>	100%
73	SM20	2s16Sf1D03	HQ614565	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
74	SM20	2s16Sf2B06	HQ614566	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
75	SM20	2s16Sf1D04	HQ614567	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Undibacterium</i>	89%
76	SM20	2s16Sf2B05	HQ614568	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Telmatospirillum</i>	90%
77	SM20	2s16Sf1C09	HQ614569	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Alphaproteobacteria</i>	99%
78	SM20	2s16Sf2B11	HQ614570	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Geothrix</i>	100%
79	SM20	2s16Sf1C10	HQ614571	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Alphaproteobacteria</i>	91%
80	SM20	2s16Sf2B09	HQ614572	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Clostridiaceae</i>	87%
81	SM20	2s16Sf1C11	HQ614573	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
82	SM20	2s16Sf2B08	HQ614574	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
83	SM20	2s16Sf1C12	HQ614575	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Acetivibrio</i>	100%
84	SM20	2s16Sf2B07	HQ614576	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
85	SM20	2s16Sf2C07	HQ614577	<i>Bacteroidetes</i>	100%	<i>Flavobacteriaceae</i>	100%
86	SM20	2s16Sf2C04	HQ614578	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
87	SM20	2s16Sf2C03	HQ614579	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
88	SM20	2s16Sf2B12	HQ614580	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
89	SM20	2s16Sf1D11	HQ614581	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
90	SM20	2s16Sf1D10	HQ614582	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Ruminococcaceae</i>	90%
91	SM20	2s16Sf1E02	HQ614583	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Anaerovorax</i>	100%
92	SM20	2s16Sf1D12	HQ614584	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
93	SM20	2s16Sf1D08	HQ614585	<i>Firmicutes</i>	100%	<i>Acetivibrio</i>	100%
94	SM20	2s16Sf1E10	HQ614586	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp3</i>	100%
95	SM20	2s16Sf1H05	HQ614587	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Desulfuromonadales</i>	100%
96	SM20	2s16Sf1E07	HQ614588	<i>Actinobacteria</i>	50%	-	-
97	SM20	2s16Sf1H09	HQ614589	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
98	SM20	2s16Sf1E09	HQ614590	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Pseudomonadaceae</i>	98%
99	SM20	2s16Sf1H06	HQ614591	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
100	SM20	2s16Sf1E03	HQ614592	<i>Proteobacteria</i>	79%	-	-
101	SM20	2s16Sf1H11	HQ614593	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
102	SM20	2s16Sf1E06	HQ614594	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp3</i>	100%
103	SM20	2s16Sf1H10	HQ614595	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
104	SM20	2s16Sf2A08	HQ614596	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
105	SM20	2s16Sf1H12	HQ614597	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Desulfuromonadales</i>	97%
106	SM20	2s16Sf2B01	HQ614598	<i>Firmicutes</i>	98%	<i>Ruminococcaceae</i>	90%
107	SM20	2s16Sf2A12	HQ614599	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Geothrix</i>	88%
108	SM20	2s16Sf2B03	HQ614600	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Acidisphaera</i>	80%
109	SM20	2s16Sf1F04	HQ614601	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
110	SM20	2s16Sf1F03	HQ614602	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
111	SM20	2s16Sf1F02	HQ614603	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Geobacter</i>	98%
112	SM20	2s16Sf1F01	HQ614604	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Rhizobiales</i>	80%
113	SM20	2s16Sf1E12	HQ614605	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
114	SM20	2s16Sf1E11	HQ614606	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
115	CG20	2c16Sf1C10	HQ614607	<i>Proteobacteria</i>	74%	-	-
116	CG20	2c16Sf1C09	HQ614608	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
117	CG20	2c16Sf1C12	HQ614609	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
118	CG20	2c16Sf1C11	HQ614610	<i>Proteobacteria</i>	89%	<i>Deltaproteobacteria</i>	83%
119	CG20	2c16Sf1D10	HQ614611	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
120	CG20	2c16Sf1D11	HQ614612	<i>Chlamydiae</i>	29%	-	-
121	CG20	2c16Sf1C06	HQ614613	<i>Thermodesulfobacteria</i>	17%	-	-
122	CG20	2c16Sf1D09	HQ614614	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
123	CG20	2c16Sf1E02	HQ614615	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
124	CG20	2c16Sf1E03	HQ614616	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
125	CG20	2c16Sf1D12	HQ614617	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
126	CG20	2c16Sf1E01	HQ614618	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
127	CG20	2c16Sf1E06	HQ614619	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
128	CG20	2c16Sf1E04	HQ614620	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	100%	<i>Ktedonobacter</i>	100%
129	CG20	2c16Sf1E05	HQ614621	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	99%
130	CG20	2c16Sf1C03	HQ614622	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
131	CG20	2c16Sf1C05	HQ614623	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
132	CG20	2c16Sf1B11	HQ614624	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Gammaproteobacteria</i>	83%
133	CG20	2c16Sf1B12	HQ614625	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
134	CG20	2c16Sf1C01	HQ614626	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Alphaproteobacteria</i>	96%
135	CG20	2c16Sf1C02	HQ614627	<i>Proteobacteria</i>	68%	-	-
136	CG20	2c16Sf1B10	HQ614628	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Betaproteobacteria</i>	95%
137	CG20	2c16Sf1B09	HQ614629	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
138	CG20	2c16Sf1B07	HQ614630	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	-	-
139	CG20	2c16Sf1B06	HQ614631	<i>Chloroflexi</i>	100%	<i>Anaerolineae</i>	100%
140	CG20	2c16Sf1B04	HQ614632	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
141	CG20	2c16Sf1B01	HQ614633	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
142	CG20	2c16Sf1B03	HQ614634	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
143	CG20	2c16Sf1A11	HQ614635	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
144	CG20	2c16Sf1A12	HQ614636	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp17</i>	100%
145	CG20	2c16Sf1A09	HQ614637	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
146	CG20	2c16Sf1A10	HQ614638	<i>Nitrospira</i>	100%	<i>Nitrospira</i>	100%
147	CG20	2c16Sf1F12	HQ614639	<i>Actinobacteria</i>	100%	<i>Actinomycetales</i>	100%
148	CG20	2c16Sf1G02	HQ614640	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
149	CG20	2c16Sf1F09	HQ614641	<i>Planctomycetes</i>	100%	<i>PlaPlanctomycetaceae</i>	100%
150	CG20	2c16Sf1F11	HQ614642	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Alphaproteobacteria</i>	99%
151	CG20	2c16Sf1A06	HQ614643	<i>Firmicutes</i>	62%	-	-
152	CG20	2c16Sf1F08	HQ614644	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria_genera_incertae_sedis</i>	99%
153	CG20	2c16Sf1A08	HQ614645	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	100%	<i>Ktedonobacter</i>	100%
154	CG20	2c16Sf1A07	HQ614646	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
155	CG20	2c16Sf1G07	HQ614647	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Betaproteobacteria</i>	97%
156	CG20	2c16Sf1G05	HQ614648	<i>Planctomycetes</i>	100%	<i>Zavarzinella</i>	92%
157	CG20	2c16Sf1G06	HQ614649	<i>Proteobacteria</i>	86%	<i>Deltaproteobacteria</i>	84%
158	CG20	2c16Sf1G03	HQ614650	<i>Proteobacteria</i>	77%	-	-
159	CG20	2c16Sf1G04	HQ614651	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
160	CG20	2c16Sf1A02	HQ614652	<i>Proteobacteria</i>	85%	<i>Deltaproteobacteria</i>	80%
161	CG20	2c16Sf1A03	HQ614653	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp3</i>	100%
162	CG20	2c16Sf1A04	HQ614654	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
163	CG20	2c16Sf1A05	HQ614655	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
164	CG20	2c16Sf1E07	HQ614656	<i>Proteobacteria</i>	98%	<i>Deltaproteobacteria</i>	96%
165	CG20	2c16Sf1E08	HQ614657	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
166	CG20	2c16Sf1E09	HQ614658	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	99%	<i>Ktedonobacter</i>	99%
167	CG20	2c16Sf1E11	HQ614659	<i>Proteobacteria</i>	90%	<i>Deltaproteobacteria</i>	88%
168	CG20	2c16Sf1F06	HQ614660	<i>Cyanobacteria</i>	21%	-	-

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
169	CG20	2c16Sf1F07	HQ614661	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
170	CG20	2c16Sf1F01	HQ614662	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Gammaproteobacteria</i>	93%
171	CG20	2c16Sf1F03	HQ614663	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
172	CG20	2c16Sf1F04	HQ614664	<i>Nitrospira</i>	100%	<i>Nitrospira</i>	100%
173	CG20	2c16Sf1F05	HQ614665	<i>Proteobacteria</i>	44%	-	-
174	CG20	2c16Sf2C04	HQ614666	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
175	CG20	2c16Sf2C03	HQ614667	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
176	CG20	2c16Sf2C02	HQ614668	<i>Proteobacteria</i>	87%	<i>Deltaproteobacteria</i>	82%
177	CG20	2c16Sf2B01	HQ614669	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
178	CG20	2c16Sf1H11	HQ614670	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
179	CG20	2c16Sf1H10	HQ614671	<i>Proteobacteria</i>	72%	-	-
180	CG20	2c16Sf2C01	HQ614672	<i>Acidobacteria</i>	99%	Gp1	99%
181	CG20	2c16Sf2B04	HQ614673	<i>Chloroflexi</i>	85%	<i>Anaerolineae</i>	83%
182	CG20	2c16Sf2B03	HQ614674	<i>Chloroflexi</i>	23%	-	-
183	CG20	2c16Sf2B02	HQ614675	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
184	CG20	2c16Sf1H04	HQ614676	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	-	-
185	CG20	2c16Sf1H03	HQ614677	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
186	CG20	2c16Sf1H09	HQ614678	<i>Chloroflexi</i>	71%	-	-
187	CG20	2c16Sf1H07	HQ614679	<i>Acidobacteria</i>	36%	-	-
188	CG20	2c16Sf1G09	HQ614680	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
189	CG20	2c16Sf1G08	HQ614681	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
190	CG20	2c16Sf1G11	HQ614682	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp7	99%
191	CG20	2c16Sf1G10	HQ614683	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
192	CG20	2c16Sf1H01	HQ614684	<i>Acidobacteria</i>	98%	Gp1	96%
193	CG20	2c16Sf1G12	HQ614685	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Rhodospirillales</i>	87%
194	CG20	2c16Sf2H04	HQ614686	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
195	CG20	2c16Sf2H02	HQ614687	<i>Chloroflexi</i>	100%	<i>Anaerolineae</i>	100%
196	CG20	2c16Sf2H01	HQ614688	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
197	CG20	2c16Sf2G03	HQ614689	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Gammaproteobacteria</i>	96%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
198	CG20	2c16Sf2G01	HQ614690	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
199	CG20	2c16Sf2E04	HQ614691	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
200	CG20	2c16Sf2E02	HQ614692	<i>Aquificae</i>	38%	-	-
201	CG20	2c16Sf2F04	HQ614693	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
202	CG20	2c16Sf2F01	HQ614694	<i>Nitrospira</i>	100%	<i>Nitrospira</i>	100%
203	CG20	2c16Sf2D03	HQ614695	<i>Acidobacteria</i>	84%	-	-
204	CG20	2c16Sf2D02	HQ614696	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
205	CG20	2c16Sf2E01	HQ614697	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
206	CG20	2c16Sf2D04	HQ614698	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
207	CG20	2c16Sf1D07	HQ614699	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
208	CG20	2c16Sf1D05	HQ614700	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
209	CG20	2c16Sf1D04	HQ614701	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
210	CG20	2c16Sf1D03	HQ614702	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>AlphaproteoRhizobiales</i>	99%
211	CG20	2c16Sf2G04	HQ614703	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
212	CG20	2c16Sf1D08	HQ614704	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
213	CG50	5c16sf2F05	HQ614705	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp7	100%
214	CG50	5c16sf2F07	HQ614706	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
215	CG50	5c16sf2F08	HQ614707	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Syntrophorhabdus</i>	98%
216	CG50	5c16sf2F09	HQ614708	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	99%	<i>Ktedonobacter</i>	99%
217	CG50	5c16sf2F10	HQ614709	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
218	CG50	5c16sf2F11	HQ614710	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
219	CG50	5c16sf1G07	HQ614711	<i>Firmicutes</i>	20%	-	-
220	CG50	5c16sf2F12	HQ614712	<i>Gemmatimonadetes</i>	65%	-	-
221	CG50	5c16sf1G06	HQ614713	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
222	CG50	5c16sf2G05	HQ614714	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
223	CG50	5c16sf1G10	HQ614715	<i>Acidobacteria</i>	99%	Gp2	99%
224	CG50	5c16sf2G06	HQ614716	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
225	CG50	5c16sf1G08	HQ614717	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
226	CG50	5c16sf2E12	HQ614718	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
227	CG50	5c16sf1D06	HQ614719	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
228	CG50	5c16sf1H05	HQ614720	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
229	CG50	5c16sf2E11	HQ614721	<i>Nitrospira</i>	42%	-	-
230	CG50	5c16sf1E02	HQ614722	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	99%	<i>Ktedonobacter</i>	99%
231	CG50	5c16sf1E05	HQ614723	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	93%	<i>Ktedonobacter</i>	93%
232	CG50	5c16sf1G01	HQ614724	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
233	CG50	5c16sf1G02	HQ614725	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
234	CG50	5c16sf1H10	HQ614726	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
235	CG50	5c16sf1G03	HQ614727	<i>Proteobacteria</i>	43%	-	-
236	CG50	5c16sf1H09	HQ614728	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
237	CG50	5c16sf1G04	HQ614729	<i>Proteobacteria</i>	68%	-	-
238	CG50	5c16sf1H08	HQ614730	<i>Firmicutes</i>	60%	-	-
239	CG50	5c16sf1H06	HQ614731	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	99%	<i>Ktedonobacter</i>	99%
240	CG50	5c16sf2D12	HQ614732	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	100%	<i>Ktedonobacter</i>	100%
241	CG50	5c16sf2E05	HQ614733	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
242	CG50	5c16sf2D10	HQ614734	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	88%	<i>Ktedonobacter</i>	88%
243	CG50	5c16sf2D11	HQ614735	<i>Spirochaetes</i>	48%	-	-
244	CG50	5c16sf2E08	HQ614736	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
245	CG50	5c16sf1D02	HQ614737	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
246	CG50	5c16sf2E10	HQ614738	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
247	CG50	5c16sf1D01	HQ614739	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	99%	<i>Ktedonobacter</i>	99%
248	CG50	5c16sf2E06	HQ614740	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
249	CG50	5c16sf1C11	HQ614741	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Betaproteobacteria</i>	99%
250	CG50	5c16sf2E07	HQ614742	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
251	CG50	5c16sf1B09	HQ614743	<i>Proteobacteria</i>	96%	<i>Gammaproteobacteria</i>	88%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
252	CG50	5c16sf2D09	HQ614744	<i>Actinobacteria</i>	17%	-	-
253	CG50	5c16sf1B10	HQ614745	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
254	CG50	5c16sf2D08	HQ614746	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
255	CG50	5c16sf1B05	HQ614747	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Betaproteobacteria</i>	97%
256	CG50	5c16sf2D07	HQ614748	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	99%	<i>Ktedonobacter</i>	99%
257	CG50	5c16sf1B06	HQ614749	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
258	CG50	5c16sf1C07	HQ614750	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	93%	<i>Ktedonobacter</i>	93%
259	CG50	5c16sf1C10	HQ614751	<i>Proteobacteria</i>	57%	-	-
260	CG50	5c16sf1B11	HQ614752	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
261	CG50	5c16sf1C05	HQ614753	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
262	CG50	5c16sf1A11	HQ614754	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
263	CG50	5c16sf1A10	HQ614755	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	97%	<i>Ktedonobacter</i>	97%
264	CG50	5c16sf1A09	HQ614756	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
265	CG50	5c16sf1A06	HQ614757	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	98%	<i>Ktedonobacter</i>	98%
266	CG50	5c16sf1A03	HQ614758	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
267	CG50	5c16sf2C05	HQ614759	<i>Proteobacteria</i>	91%	<i>Deltaproteobacteria</i>	90%
268	CG50	5c16sf1A02	HQ614760	<i>Bacteria_incert ae_sedis</i>	95%	<i>Ktedonobacter</i>	95%
269	CG50	5c16sf2C06	HQ614761	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
270	CG50	5c16sf2B11	HQ614762	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
271	CG50	5c16sf2B12	HQ614763	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
272	CG50	5c16sf2D06	HQ614764	<i>Aquificae</i>	26%	-	-
273	CG50	5c16sf1B02	HQ614765	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Rhizobiales</i>	83%
274	CG50	5c16sf2D05	HQ614766	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
275	CG50	5c16sf1B03	HQ614767	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp13</i>	100%
276	CG50	5c16sf2C11	HQ614768	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Anaeromyxobacter</i>	99%
277	CG50	5c16sf2C10	HQ614769	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Alphaproteobacteria</i>	99%
278	CG50	5c16sf2C09	HQ614770	<i>Firmicutes</i>	15%	-	-

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
279	CG50	5c16sf2C08	HQ614771	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
280	CG50	5c16sf2C07	HQ614772	<i>Bacteroidetes</i>	35%	-	-
281	CG50	5c16sf2G08	HQ614773	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
282	CG50	5c16sf2G09	HQ614774	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Anaeromyxobacter</i>	97%
283	CG50	5c16sf2A12	HQ614775	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	97%	<i>Ktedonobacter</i>	97%
284	CG50	5c16sf2H08	HQ614776	<i>Aquificae</i>	15%	-	-
285	CG50	5c16sf2H09	HQ614777	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
286	CG50	5c16sf2G12	HQ614778	<i>Chloroflexi</i>	67%	-	-
287	CG50	5c16sf1H11	HQ614779	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	97%	<i>Ktedonobacter</i>	97%
288	CG50	5c16sf2H06	HQ614780	<i>Bacteroidetes</i>	42%	-	-
289	CG50	5c16sf1H12	HQ614781	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
290	CG50	5c16sf2G10	HQ614782	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	100%
291	CG50	5c16sf2A09	HQ614783	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	91%	<i>Ktedonobacter</i>	91%
292	CG50	5c16sf2G11	HQ614784	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Burkholderiales</i>	99%
293	CG50	5c16sf2A11	HQ614785	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
294	CG50	5c16sf2B08	HQ614786	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
295	CG50	5c16sf2B07	HQ614787	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
296	CG50	5c16sf2B10	HQ614788	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Desulfuromonadales</i>	98%
297	CG50	5c16sf1H03	HQ614789	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
298	CG50	5c16sf2B09	HQ614790	<i>Nitrospira</i>	50%	-	-
299	CG50	5c16sf1H04	HQ614791	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
300	CG50	5c16sf1H01	HQ614792	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
301	CG50	5c16sf1H02	HQ614793	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
302	CG50	5c16sf1G11	HQ614794	<i>Proteobacteria</i>	62%	-	-
303	CG50	5c16sf2B06	HQ614795	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
304	CG50	5c16sf2G07	HQ614796	<i>Proteobacteria</i>	97%	<i>Deltaproteobacteria</i>	95%
305	CG50	5c16sf1G12	HQ614797	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
306	CG50	5c16sf2B05	HQ614798	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
307	PA20	2p16Sf4E08	HQ614799	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
308	PA20	2p16Sf1E01	HQ614800	<i>Proteobacteria</i>	93%	<i>Deltaproteobacteria</i>	93%
309	PA20	2p16Sf1D12	HQ614801	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp3</i>	100%
310	PA20	2p16Sf1D11	HQ614802	<i>Chloroflexi</i>	70%	-	-
311	PA20	2p16Sf1D08	HQ614803	<i>Proteobacteria</i>	40%	-	-
312	PA20	2p16Sf4F01	HQ614804	<i>Nitrospira</i>	98%	<i>Nitrospira</i>	96%
313	PA20	2p16Sf4E11	HQ614805	<i>Firmicutes</i>	66%	-	-
314	PA20	2p16Sf4E10	HQ614806	<i>Proteobacteria</i>	93%	<i>Deltaproteobacteria</i>	92%
315	PA20	2p16Sf4E09	HQ614807	<i>Deinococcus-Thermus</i>	37%	-	-
316	PA20	2p16Sf3F10	HQ614808	<i>Proteobacteria</i>	69%	-	-
317	PA20	2p16Sf3G07	HQ614809	<i>Proteobacteria</i>	49%	-	-
318	PA20	2p16Sf3G08	HQ614810	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	97%
319	PA20	2p16Sf3G05	HQ614811	<i>Chloroflexi</i>	99%	<i>Anaerolineae</i>	98%
320	PA20	2p16Sf3G06	HQ614812	<i>Proteobacteria</i>	68%	-	-
321	PA20	2p16Sf3G03	HQ614813	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	100%	<i>Ktedonobacter</i>	100%
322	PA20	2p16Sf3G04	HQ614814	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Desulfuromonadales</i>	100%
323	PA20	2p16Sf3G01	HQ614815	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp13</i>	100%
324	PA20	2p16Sf3G02	HQ614816	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>DGeobacteraceae</i>	81%
325	PA20	2p16Sf4E03	HQ614817	<i>Deferribacteres</i>	38%	-	-
326	PA20	2p16Sf1E03	HQ614818	<i>Proteobacteria</i>	91%	<i>Deltaproteobacteria</i>	90%
327	PA20	2p16Sf3F11	HQ614819	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Gammaproteobacteria</i>	93%
328	PA20	2p16Sf4E05	HQ614820	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
329	PA20	2p16Sf1E04	HQ614821	<i>Proteobacteria</i>	53%	-	-
330	PA20	2p16Sf3F12	HQ614822	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	99%	<i>Ktedonobacter</i>	99%
331	PA20	2p16Sf4E01	HQ614823	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	100%	<i>Ktedonobacter</i>	100%
332	PA20	2p16Sf4E02	HQ614824	<i>Proteobacteria</i>	67%	-	-
333	PA20	2p16Sf1E02	HQ614825	<i>Proteobacteria</i>	96%	<i>Deltaproteobacteria</i>	96%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
334	PA20	2p16Sf1E07	HQ614826	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Deltaproteobacteria</i>	100%
335	PA20	2p16Sf1E08	HQ614827	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%
336	PA20	2p16Sf4E06	HQ614828	<i>Chloroflexi</i>	89%	<i>Dehalococcoidetes</i>	84%
337	PA20	2p16Sf1E05	HQ614829	<i>Proteobacteria</i>	77%	-	-
338	PA20	2p16Sf4E07	HQ614830	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	100%
339	PA20	2p16Sf1E06	HQ614831	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%
340	PA20	2p16Sf1E10	HQ614832	<i>Actinobacteria</i>	59%	-	-
341	PA20	2p16Sf1E09	HQ614833	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
342	PA20	2p16Sf4G02	HQ614834	<i>Acidobacteria</i>	96%	<i>Gp23</i>	96%
343	PA20	2p16Sf4G01	HQ614835	<i>Proteobacteria</i>	38%	-	-
344	PA20	2p16Sf1E11	HQ614836	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	97%
345	PA20	2p16Sf4G04	HQ614837	<i>Chloroflexi</i>	79%	-	-
346	PA20	2p16Sf4G03	HQ614838	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
347	PA20	2p16Sf4G06	HQ614839	<i>Firmicutes</i>	73%	-	-
348	PA20	2p16Sf4G05	HQ614840	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
349	PA20	2p16Sf4F02	HQ614841	<i>Chloroflexi</i>	53%	-	-
350	PA20	2p16Sf1F01	HQ614842	<i>Chloroflexi</i>	96%	<i>Dehalococcoidetes</i>	92%
351	PA20	2p16Sf4F06	HQ614843	<i>Actinobacteria</i>	21%	-	-
352	PA20	2p16Sf1F02	HQ614844	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
353	PA20	2p16Sf4F07	HQ614845	<i>Planctomycetes</i>	28%	-	-
354	PA20	2p16Sf1F03	HQ614846	<i>Proteobacteria</i>	98%	<i>Deltaproteobacteria</i>	98%
355	PA20	2p16Sf4F09	HQ614847	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
356	PA20	2p16Sf1F04	HQ614848	<i>Spirochaetes</i>	44%	-	-
357	PA20	2p16Sf4F11	HQ614849	<i>Nitrospira</i>	99%	<i>Nitrospira</i>	97%
358	PA20	2p16Sf1F05	HQ614850	<i>Firmicutes</i>	42%	-	-
359	PA20	2p16Sf1F06	HQ614851	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	98%	<i>Ktedonobacter</i>	98%
360	PA20	2p16Sf1F07	HQ614852	<i>Spirochaetes</i>	46%	-	-
361	PA20	2p16Sf1F08	HQ614853	<i>Chloroflexi</i>	91%	-	-
362	PA20	2p16Sf4H08	HQ614854	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
363	PA20	2p16Sf4H06	HQ614855	<i>Chlorobi</i>	19%	-	-
364	PA20	2p16Sf4H05	HQ614856	<i>Proteobacteria</i>	37%	-	-
365	PA20	2p16Sf4H03	HQ614857	<i>Chloroflexi</i>	64%	-	-
366	PA20	2p16Sf4H02	HQ614858	<i>Proteobacteria</i>	34%	-	-
367	PA20	2p16Sf4H01	HQ614859	<i>Firmicutes</i>	40%	-	-
368	PA20	2p16Sf4G12	HQ614860	<i>Proteobacteria</i>	37%	-	-
369	PA20	2p16Sf1F11	HQ614861	<i>Proteobacteria</i>	85%	-	-
370	PA20	2p16Sf1F09	HQ614862	<i>Chloroflexi</i>	88%	<i>Anaerolineae</i>	87%
371	PA20	2p16Sf3D11	HQ614863	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
372	PA20	2p16Sf3D09	HQ614864	<i>Chloroflexi</i>	39%	-	-
373	PA20	2p16Sf3D08	HQ614865	<i>Deferribacteres</i>	13%	-	-
374	PA20	2p16Sf3E02	HQ614866	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%
375	PA20	2p16Sf1G02	HQ614867	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Deltaproteobacteria</i>	98%
376	PA20	2p16Sf3E03	HQ614868	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Gammaproteobacteria</i>	96%
377	PA20	2p16Sf3D12	HQ614869	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
378	PA20	2p16Sf3E01	HQ614870	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
379	PA20	2p16Sf3E06	HQ614871	<i>Chloroflexi</i>	73%	-	-
380	PA20	2p16Sf3E07	HQ614872	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Desulfuromonadales</i>	100%
381	PA20	2p16Sf3E04	HQ614873	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp13</i>	100%
382	PA20	2p16Sf3E05	HQ614874	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
383	PA20	2p16Sf1H02	HQ614875	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
384	PA20	2p16Sf1H03	HQ614876	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Betaproteobacteria</i>	98%
385	PA20	2p16Sf1G09	HQ614877	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Alphaproteobacteria</i>	96%
386	PA20	2p16Sf1G10	HQ614878	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	99%	<i>Ktedonobacter</i>	99%
387	PA20	2p16Sf4G09	HQ614879	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
388	PA20	2p16Sf1G07	HQ614880	<i>Chloroflexi</i>	49%	-	-
389	PA20	2p16Sf4G10	HQ614881	<i>Proteobacteria</i>	97%	<i>Deltaproteobacteria</i>	97%
390	PA20	2p16Sf1G08	HQ614882	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%
391	PA20	2p16Sf4G07	HQ614883	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
392	PA20	2p16Sf1G05	HQ614884	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
393	PA20	2p16Sf4G08	HQ614885	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
394	PA20	2p16Sf1G06	HQ614886	<i>Actinobacteria</i>	83%	<i>Actinobacteria</i>	83%
395	PA20	2p16Sf1H06	HQ614887	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
396	PA20	2p16Sf3E09	HQ614888	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp18	100%
397	PA20	2p16Sf3E08	HQ614889	<i>Proteobacteria</i>	98%	<i>Deltaproteobacteria</i>	97%
398	PA20	2p16Sf3E11	HQ614890	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Betaproteobacteria</i>	96%
399	PA20	2p16Sf3E12	HQ614891	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
400	PA20	2p16Sf1H07	HQ614892	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
401	PA20	2p16Sf3F01	HQ614893	<i>Chloroflexi</i>	69%	-	-
402	PA20	2p16Sf1H09	HQ614894	<i>Firmicutes</i>	35%	-	-
403	PA20	2p16Sf3F03	HQ614895	<i>Chloroflexi</i>	36%	-	-
404	PA20	2p16Sf3F04	HQ614896	<i>Lentisphaerae</i>	24%	-	-
405	PA20	2p16Sf3F07	HQ614897	<i>Proteobacteria</i>	93%	<i>Deltaproteobacteria</i>	92%
406	PA20	2p16Sf3F08	HQ614898	<i>Firmicutes</i>	38%	-	-
407	PA20	2p16Sf3F09	HQ614899	<i>Proteobacteria</i>	46%	-	-
408	PA20	2p16Sf2A10	HQ614900	<i>Proteobacteria</i>	32%	-	-
409	PA20	2p16Sf2A12	HQ614901	<i>Verrucomicrobia</i>	98%	-	-
410	PA20	2p16Sf2B01	HQ614902	<i>Proteobacteria</i>	77%	-	-
411	PA20	2p16Sf2B02	HQ614903	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
412	PA20	2p16Sf4H09	HQ614904	<i>Bacteroidetes</i>	100%	-	-
413	PA20	2p16Sf1H10	HQ614905	<i>Chloroflexi</i>	88%	-	-
414	PA20	2p16Sf2A01	HQ614906	<i>Firmicutes</i>	73%	-	-
415	PA20	2p16Sf2A07	HQ614907	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
416	PA20	2p16Sf2A09	HQ614908	<i>Bacteroidetes</i>	29%	-	-
417	PA20	2p16Sf3E10	HQ614909	<i>Proteobacteria</i>	98%	<i>Deltaproteobacteria</i>	98%
418	PA20	2p16Sf3B04	HQ614910	<i>Chloroflexi</i>	79%	-	-
419	PA20	2p16Sf3B02	HQ614911	<i>Proteobacteria</i>	96%	<i>Deltaproteobacteria</i>	95%
420	PA20	2p16Sf3B03	HQ614912	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
421	PA20	2p16Sf3A12	HQ614913	<i>Verrucomicrobia</i>	99%	-	-
422	PA20	2p16Sf3B01	HQ614914	<i>Nitrospira</i>	99%	<i>Nitrospira</i>	96%
423	PA20	2p16Sf3B12	HQ614915	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp13</i>	100%
424	PA20	2p16Sf3B10	HQ614916	<i>Firmicutes</i>	68%	-	-
425	PA20	2p16Sf3B09	HQ614917	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
426	PA20	2p16Sf3B08	HQ614918	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Deltaproteobacteria</i>	98%
427	PA20	2p16Sf3B06	HQ614919	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	100%
428	PA20	2p16Sf3B05	HQ614920	<i>Proteobacteria</i>	98%	<i>Deltaproteobacteria</i>	93%
429	PA20	2p16Sf3C01	HQ614921	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
430	PA20	2p16Sf3C03	HQ614922	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp13</i>	100%
431	PA20	2p16Sf3C05	HQ614923	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria_genera_incertae_sedis</i>	99%
432	PA20	2p16Sf3C06	HQ614924	<i>Chloroflexi</i>	96%	<i>Dehalogenimonas</i>	95%
433	PA20	2p16Sf1A01	HQ614925	<i>Proteobacteria</i>	98%	<i>Deltaproteobacteria</i>	97%
434	PA20	2p16Sf1A03	HQ614926	<i>Proteobacteria</i>	69%	-	-
435	PA20	2p16Sf1A02	HQ614927	<i>Proteobacteria</i>	64%	-	-
436	PA20	2p16Sf1A07	HQ614928	<i>Chloroflexi</i>	52%	-	-
437	PA20	2p16Sf1A06	HQ614929	<i>Chloroflexi</i>	100%	<i>Anaerolineae</i>	100%
438	PA20	2p16Sf3D04	HQ614930	<i>Nitrospira</i>	96%	<i>Nitrospira</i>	95%
439	PA20	2p16Sf3D02	HQ614931	<i>Proteobacteria</i>	90%	<i>Deltaproteobacteria</i>	85%
440	PA20	2p16Sf3D07	HQ614932	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	100%
441	PA20	2p16Sf3D06	HQ614933	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Acetobacteraceae</i>	100%
442	PA20	2p16Sf3C09	HQ614934	<i>Chloroflexi</i>	64%	-	-
443	PA20	2p16Sf3C11	HQ614935	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
444	PA20	2p16Sf3C10	HQ614936	<i>Proteobacteria</i>	32%	-	-
445	PA20	2p16Sf2G03	HQ614937	<i>Chloroflexi</i>	76%	-	-
446	PA20	2p16Sf2G04	HQ614938	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Betaproteobacteria</i>	92%
447	PA20	2p16Sf2F11	HQ614939	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp13</i>	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
448	PA20	2p16Sf2F12	HQ614940	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
449	PA20	2p16Sf2G09	HQ614941	<i>Spirochaetes</i>	62%	-	-
450	PA20	2p16Sf2G05	HQ614942	<i>Proteobacteria</i>	95%	<i>Deltaproteobacteria</i>	95%
451	PA20	2p16Sf2G07	HQ614943	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
452	PA20	2p16Sf1B02	HQ614944	<i>Proteobacteria</i>	89%	<i>Deltaproteobacteria</i>	86%
453	PA20	2p16Sf1B03	HQ614945	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp2	100%
454	PA20	2p16Sf1A12	HQ614946	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
455	PA20	2p16Sf1B01	HQ614947	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	100%
456	PA20	2p16Sf1A09	HQ614948	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Methylocystis</i>	98%
457	PA20	2p16Sf1A10	HQ614949	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Rhodocyclaceae</i>	84%
458	PA20	2p16Sf1B08	HQ614950	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%
459	PA20	2p16Sf1B07	HQ614951	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
460	PA20	2p16Sf1B06	HQ614952	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
461	PA20	2p16Sf1B05	HQ614953	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Prosthecomicrobium</i>	85%
462	PA20	2p16Sf1B04	HQ614954	<i>Proteobacteria</i>	100%	-	-
463	PA20	2p16Sf2H05	HQ614955	<i>Proteobacteria</i>	97%	<i>Deltaproteobacteria</i>	96%
464	PA20	2p16Sf2H03	HQ614956	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
465	PA20	2p16Sf2H02	HQ614957	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
466	PA20	2p16Sf2G10	HQ614958	<i>Planctomycetes</i>	21%	-	-
467	PA20	2p16Sf2H06	HQ614959	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	94%	<i>Ktedonobacter</i>	94%
468	PA20	2p16Sf2H08	HQ614960	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%
469	PA20	2p16Sf2H09	HQ614961	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp13	100%
470	PA20	2p16Sf2H10	HQ614962	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp3	100%
471	PA20	2p16Sf3A02	HQ614963	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%
472	PA20	2p16Sf3A04	HQ614964	<i>Acidobacteria</i>	100%	Gp1	100%
473	PA20	2p16Sf1C08	HQ614965	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%
474	PA20	2p16Sf1B09	HQ614966	<i>Proteobacteria</i>	99%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%
475	PA20	2p16Sf1B12	HQ614967	<i>Bacteroidetes</i>	100%	<i>Chitinophagaceae</i>	100%
476	PA20	2p16Sf1C01	HQ614968	<i>Chloroflexi</i>	13%	-	-

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
477	PA20	2p16Sf1C02	HQ614969	<i>Chloroflexi</i>	100%	<i>Anaerolineae</i>	100%
478	PA20	2p16Sf1D05	HQ614970	<i>Firmicutes</i>	49%	-	-
479	PA20	2p16Sf1D04	HQ614971	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	100%	<i>Ktedonobacter</i>	100%
480	PA20	2p16Sf1D07	HQ614972	<i>Bacteria_incertae_sedis</i>	96%	<i>Ktedonobacter</i>	96%
481	PA20	2p16Sf1D06	HQ614973	<i>Chloroflexi</i>	74%	-	-
482	PA20	2p16Sf1D02	HQ614974	<i>Proteobacteria</i>	97%	<i>Deltaproteobacteria</i>	97%
483	PA20	2p16Sf1D01	HQ614975	<i>Chloroflexi</i>	21%	-	-
484	PA20	2p16Sf3A05	HQ614976	<i>Proteobacteria</i>	40%	-	-
485	PA20	2p16Sf3A08	HQ614977	<i>Actinobacteria</i>	85%	<i>Actinobacteria</i>	85%
486	PA20	2p16Sf3A06	HQ614978	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
487	PA20	2p16Sf3A11	HQ614979	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Beijerinckiaceae</i>	89%
488	PA20	2p16Sf3A10	HQ614980	<i>Firmicutes</i>	37%	-	-
489	PA20	2p16Sf2F06	HQ614981	<i>Chloroflexi</i>	37%	-	-
490	PA20	2p16Sf2F10	HQ614982	<i>Spirochaetes</i>	43%	-	-
491	PA20	2p16Sf2F04	HQ614983	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Syntrophaceae</i>	100%
492	PA20	2p16Sf2E07	HQ614984	<i>Chloroflexi</i>	57%	-	-
493	PA20	2p16Sf2E06	HQ614985	<i>Proteobacteria</i>	51%	-	-
494	PA20	2p16Sf2E05	HQ614986	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Rhodocyclaceae</i>	86%
495	PA20	2p16Sf2E04	HQ614987	<i>Proteobacteria</i>	92%	<i>Deltaproteobacteria</i>	92%
496	PA20	2p16Sf2F03	HQ614988	<i>Proteobacteria</i>	47%	-	-
497	PA20	2p16Sf2F01	HQ614989	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Opitut</i>	97%
498	PA20	2p16Sf2E09	HQ614990	<i>Proteobacteria</i>	48%	-	-
499	PA20	2p16Sf2E08	HQ614991	<i>Chloroflexi</i>	69%	-	-
500	PA20	2p16Sf2D12	HQ614992	<i>Firmicutes</i>	83%	-	-
501	PA20	2p16Sf2E02	HQ614993	<i>Proteobacteria</i>	97%	<i>Deltaproteobacteria</i>	97%
502	PA20	2p16Sf2D11	HQ614994	<i>Acidobacteria</i>	99%	<i>Gp1</i>	98%
503	PA20	2p16Sf2C10	HQ614995	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Rhodospirillaceae</i>	81%
504	PA20	2p16Sf2C09	HQ614996	<i>Nitrospira</i>	37%	-	-

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
505	PA20	2p16Sf2D02	HQ614997	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Syntrophaceae</i>	100%
506	PA20	2p16Sf2D01	HQ614998	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
507	PA20	2p16Sf2D05	HQ614999	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Deltaproteobacteria</i>	99%
508	PA20	2p16Sf2D04	HQ615000	<i>Proteobacteria</i>	94%	-	-
509	PA20	2p16Sf2D10	HQ615001	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
510	PA20	2p16Sf2D07	HQ615002	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	100%
511	PA20	2p16Sf2C07	HQ615003	<i>Chloroflexi</i>	67%	-	-
512	PA20	2p16Sf4A12	HQ615004	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
513	PA20	2p16Sf2B09	HQ615005	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
514	PA20	2p16Sf4A11	HQ615006	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
515	PA20	2p16Sf2B08	HQ615007	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
516	PA20	2p16Sf4A07	HQ615008	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
517	PA20	2p16Sf2C02	HQ615009	<i>Chloroflexi</i>	80%	-	-
518	PA20	2p16Sf4A05	HQ615010	<i>Actinobacteria</i>	86%	<i>Coriobacteriaceae</i>	82%
519	PA20	2p16Sf2C01	HQ615011	<i>Proteobacteria</i>	65%	-	-
520	PA20	2p16Sf4A03	HQ615012	<i>Proteobacteria</i>	95%	<i>Deltaproteobacteria</i>	91%
521	PA20	2p16Sf2C04	HQ615013	<i>OP10</i>	94%	<i>OP10_genera_incertae_sedis</i>	94%
522	PA20	2p16Sf4A01	HQ615014	<i>Proteobacteria</i>	76%	-	-
523	PA20	2p16Sf2C03	HQ615015	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp2</i>	100%
524	PA20	2p16Sf3H12	HQ615016	<i>Proteobacteria</i>	92%	<i>Deltaproteobacteria</i>	92%
525	PA20	2p16Sf2C06	HQ615017	<i>Spirochaetes</i>	60%	-	-
526	PA20	2p16Sf3H11	HQ615018	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp13</i>	100%
527	PA20	2p16Sf2B03	HQ615019	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
528	PA20	2p16Sf2B07	HQ615020	<i>Proteobacteria</i>	32%	-	-
529	PA20	2p16Sf4B02	HQ615021	<i>Actinobacteria</i>	41%	-	-
530	PA20	2p16Sf2B06	HQ615022	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
531	PA20	2p16Sf4B05	HQ615023	<i>Proteobacteria</i>	47%	-	-
532	PA20	2p16Sf4B07	HQ615024	<i>Chloroflexi</i>	18%	-	-

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
533	PA20	2p16Sf3H05	HQ615025	<i>Verrucomicrobi</i> <i>a</i>	100%	<i>Subdivision3_gener</i> <i>a_incertae_sedis</i>	100%
534	PA20	2p16Sf3H04	HQ615026	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Rhizobiales</i>	100%
535	PA20	2p16Sf3H07	HQ615027	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Desulfuromonadales</i>	97%
536	PA20	2p16Sf3H06	HQ615028	<i>Bacteria_incert</i> <i>ae_sedis</i>	97%	<i>Ktedonobacter</i>	97%
537	PA20	2p16Sf3G11	HQ615029	<i>Proteobacteria</i>	97%	<i>Deltaproteobacteria</i>	96%
538	PA20	2p16Sf3G09	HQ615030	<i>WS3</i>	98%	<i>WS3_genera_incert</i> <i>ae_sedis</i>	98%
539	PA20	2p16Sf3H02	HQ615031	<i>Chlorobi</i>	30%	-	-
540	PA20	2p16Sf3G12	HQ615032	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
541	PA20	2p16Sf3H09	HQ615033	<i>Proteobacteria</i>	43%	-	-
542	PA20	2p16Sf3H08	HQ615034	<i>Proteobacteria</i>	37%	-	-
543	PA20	2p16Sf3H10	HQ615035	<i>Bacteria_incert</i> <i>ae_sedis</i>	99%	<i>Ktedonobacter</i>	99%
544	PA20	2p16Sf4D02	HQ615036	<i>Chloroflexi</i>	23%	-	-
545	PA20	2p16Sf4D01	HQ615037	<i>Proteobacteria</i>	92%	<i>Deltaproteobacteria</i>	92%
546	PA20	2p16Sf4C12	HQ615038	<i>Planctomycetes</i>	29%	-	-
547	PA20	2p16Sf4C09	HQ615039	<i>Chlamydiae</i>	45%	-	-
548	PA20	2p16Sf4D06	HQ615040	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Rhodospirillales</i>	82%
549	PA20	2p16Sf4D05	HQ615041	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp3</i>	100%
550	PA20	2p16Sf4D03	HQ615042	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
551	PA20	2p16Sf4D10	HQ615043	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Geobacter</i>	81%
552	PA20	2p16Sf4D11	HQ615044	<i>Bacteria_incert</i> <i>ae_sedis</i>	99%	<i>Ktedonobacter</i>	99%
553	PA20	2p16Sf4D07	HQ615045	<i>Chlorobi</i>	38%	-	-
554	PA20	2p16Sf4D09	HQ615046	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp13</i>	100%
555	PA20	2p16Sf4B09	HQ615047	<i>Proteobacteria</i>	85%	-	-
556	PA20	2p16Sf4B08	HQ615048	<i>Proteobacteria</i>	100%	<i>Desulfuromonadales</i>	100%
557	PA20	2p16Sf4B12	HQ615049	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	100%
558	PA20	2p16Sf4B10	HQ615050	<i>Firmicutes</i>	62%	-	-
559	PA20	2p16Sf4C03	HQ615051	<i>Nitrospira</i>	98%	<i>Nitrospira</i>	98%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
560	PA20	2p16Sf4C02	HQ615052	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp18</i>	100%
561	PA20	2p16Sf4C05	HQ615053	<i>Nitrospira</i>	100%	<i>Nitrospira</i>	100%
562	PA20	2p16Sf4C04	HQ615054	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp1</i>	99%
563	PA20	2p16Sf4C06	HQ615055	<i>Chlorobi</i>	16%	-	-
564	PA20	2p16Sf4C07	HQ615056	<i>Acidobacteria</i>	100%	<i>Gp16</i>	100%
565	PA20	2p16Sf4C08	HQ615057	<i>Proteobacteria</i>	56%	-	-

As sequências do gene *SSU rRNA* de *Bacteria* foram classificadas através do programa *Classifier* e utilizando o banco de dados do *RDPII* como referência (disponível no sítio: <http://rdp.cme.msu.edu/>). Na coluna “*GenBank ID*” é mostrado o código identificador das seqüências no banco de genes *GenBank* (disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Na coluna “Classificação mais profunda” é mostrada somente a classificação taxonômica das sequências que apresentaram limites de confiança $\geq 80\%$. O limite de confiança representa a probabilidade de uma determinada seqüência pertencer àquela taxonomia.

APÊNDICE 4 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS SEQUÊNCIAS DO GENE SSU *rRNA*
DOMÍNIO ARCHAEA

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
1	SM20	2sArq3G11	HQ613951	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
2	SM20	2sArq3G12	HQ613952	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
3	SM20	2sArq3H02	HQ613953	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
4	SM20	2sArq3H04	HQ613954	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
5	SM20	2sArq3G08	HQ613955	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
6	SM20	2sArq3G09	HQ613956	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
7	SM20	2sArq3G10	HQ613957	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
8	SM20	2sArq2A09	HQ613958	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
9	SM20	2sArq3G04	HQ613959	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
10	SM20	2sArq2A06	HQ613960	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
11	SM20	2sArq3G03	HQ613961	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
12	SM20	2sArq2A05	HQ613962	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	99%
13	SM20	2sArq3G06	HQ613963	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
14	SM20	2sArq2A08	HQ613964	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
15	SM20	2sArq3G05	HQ613965	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
16	SM20	2sArq2A07	HQ613966	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
17	SM20	2sArq1H10	HQ613967	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
18	SM20	2sArq1H09	HQ613968	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
19	SM20	2sArq2A04	HQ613969	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
20	SM20	2sArq2A01	HQ613970	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
21	SM20	2sArq1H05	HQ613971	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
22	SM20	2sArq3G01	HQ613972	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
23	SM20	2sArq3G02	HQ613973	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
24	SM20	2sArq3F10	HQ613974	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
25	SM20	2sArq3F12	HQ613975	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
26	SM20	2sArq3F06	HQ613976	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
27	SM20	2sArq3F08	HQ613977	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
28	SM20	2sArq1H03	HQ613978	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
29	SM20	2sArq3F05	HQ613979	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
30	SM20	2sArq1H02	HQ613980	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
31	SM20	2sArq3F04	HQ613981	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
32	SM20	2sArq1G12	HQ613982	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
33	SM20	2sArq3F02	HQ613983	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
34	SM20	2sArq1G10	HQ613984	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
35	SM20	2sArq3F01	HQ613985	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
36	SM20	2sArq1G09	HQ613986	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
37	SM20	2sArq3E12	HQ613987	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
38	SM20	2sArq1G06	HQ613988	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
39	SM20	2sArq1G04	HQ613989	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
40	SM20	2sArq1G03	HQ613990	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	99%
41	SM20	2sArq1G02	HQ613991	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
42	SM20	2sArq1F12	HQ613992	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
43	SM20	2sArq2E09	HQ613993	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanoregula</i>	100%
44	SM20	2sArq2E08	HQ613994	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
45	SM20	2sArq2E10	HQ613995	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
46	SM20	2sArq2D09	HQ613996	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
47	SM20	2sArq2D12	HQ613997	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
48	SM20	2sArq2D11	HQ613998	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
49	SM20	2sArq2E04	HQ613999	<i>Crenarchaeota</i>	95%	-	-
50	SM20	2sArq2E03	HQ614000	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
51	SM20	2sArq2E07	HQ614001	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
52	SM20	2sArq2E05	HQ614002	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
53	SM20	2sArq2D07	HQ614003	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
54	SM20	2sArq3H10	HQ614004	<i>Crenarchaeota</i>	91%	-	-
55	SM20	2sArq2D06	HQ614005	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
56	SM20	2sArq3H08	HQ614006	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
57	SM20	2sArq2D05	HQ614007	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
58	SM20	2sArq3H06	HQ614008	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanoregula</i>	93%
59	SM20	2sArq2D04	HQ614009	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
60	SM20	2sArq2C03	HQ614010	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
61	SM20	2sArq2A12	HQ614011	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
62	SM20	2sArq2D01	HQ614012	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
63	SM20	2sArq2C12	HQ614013	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
64	SM20	2sArq2C07	HQ614014	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
65	SM20	2sArq2C04	HQ614015	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
66	SM20	2sArq3B01	HQ614016	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
67	SM20	2sArq3B05	HQ614017	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
68	SM20	2sArq3B03	HQ614018	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
69	SM20	2sArq2H10	HQ614019	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
70	SM20	2sArq2H09	HQ614020	<i>Crenarchaeota</i>	100%	SAGMCG-1	85%
71	SM20	2sArq2G07	HQ614021	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
72	SM20	2sArq2G09	HQ614022	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
73	SM20	2sArq2G10	HQ614023	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
74	SM20	2sArq2G01	HQ614024	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanoregula</i>	93%
75	SM20	2sArq2G02	HQ614025	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
76	SM20	2sArq2G05	HQ614026	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
77	SM20	2sArq2G06	HQ614027	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
78	SM20	2sArq2H05	HQ614028	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
79	SM20	2sArq1A08	HQ614029	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
80	SM20	2sArq2F12	HQ614030	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
81	SM20	2sArq1A10	HQ614031	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
82	SM20	2sArq1A03	HQ614032	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
83	SM20	2sArq1A07	HQ614033	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
84	SM20	2sArq1A02	HQ614034	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
85	SM20	2sArq2F08	HQ614035	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
86	SM20	2sArq2F09	HQ614036	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	98%
87	SM20	2sArq2F05	HQ614037	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
88	SM20	2sArq2F07	HQ614038	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
89	SM20	2sArq2F02	HQ614039	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
90	SM20	2sArq2F03	HQ614040	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
91	SM20	2sArq2E11	HQ614041	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
92	SM20	2sArq1A11	HQ614042	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
93	SM20	2sArq2F01	HQ614043	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
94	SM20	2sArq2F10	HQ614044	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
95	SM20	2sArq2F11	HQ614045	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
96	SM20	2sArq3E04	HQ614046	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
97	SM20	2sArq3E07	HQ614047	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
98	SM20	2sArq3E06	HQ614048	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
99	SM20	2sArq3E10	HQ614049	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
100	SM20	2sArq1B01	HQ614050	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanomicrobiaceae</i>	100%
101	SM20	2sArq3E08	HQ614051	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
102	SM20	2sArq1B07	HQ614052	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
103	SM20	2sArq1B11	HQ614053	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
104	SM20	2sArq1D02	HQ614054	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
105	SM20	2sArq1D05	HQ614055	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
106	SM20	2sArq1D06	HQ614056	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
107	SM20	2sArq1D07	HQ614057	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
108	SM20	2sArq1D10	HQ614058	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
109	SM20	2sArq1D11	HQ614059	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
110	SM20	2sArq1E05	HQ614060	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
111	SM20	2sArq3D08	HQ614061	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
112	SM20	2sArq3D10	HQ614062	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
113	SM20	2sArq3D11	HQ614063	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
114	SM20	2sArq3E01	HQ614064	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	96%
115	SM20	2sArq3E02	HQ614065	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
116	SM20	2sArq3E03	HQ614066	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
117	SM20	2sArq3D05	HQ614067	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
118	SM20	2sArq1E09	HQ614068	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	94%
119	SM20	2sArq3D03	HQ614069	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
120	SM20	2sArq1E12	HQ614070	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
121	SM20	2sArq3D02	HQ614071	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
122	SM20	2sArq3D01	HQ614072	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
123	SM20	2sArq1E07	HQ614073	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
124	SM20	2sArq1F04	HQ614074	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
125	SM20	2sArq1F01	HQ614075	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
126	SM20	2sArq1F02	HQ614076	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
127	SM20	2sArq1F11	HQ614077	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
128	SM20	2sArq1F06	HQ614078	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
129	SM20	2sArq1F07	HQ614079	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
130	SM20	2sArq3A02	HQ614080	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
131	SM20	2sArq3A04	HQ614081	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
132	SM20	2sArq2H11	HQ614082	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	97%
133	SM20	2sArq3A01	HQ614083	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
134	SM20	2sArq3A11	HQ614084	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
135	SM20	2sArq3A12	HQ614085	<i>Crenarchaeota</i>	100%	AK59	100%
136	SM20	2sArq3A06	HQ614086	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
137	SM20	2sArq3A07	HQ614087	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
138	SM20	2sArq3B10	HQ614088	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	99%
139	SM20	2sArq3B11	HQ614089	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
140	SM20	2sArq3B07	HQ614090	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
141	SM20	2sArq3B09	HQ614091	<i>Crenarchaeota</i>	93%	-	-
142	SM20	2sArq3C09	HQ614092	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
143	SM20	2sArq3C01	HQ614093	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
144	SM20	2sArq3C03	HQ614094	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
145	CG20	2cArq3H10	HQ614095	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
146	CG20	2cArq3H11	HQ614096	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
147	CG20	2cArq3H09	HQ614097	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
148	CG20	2cArq3G06	HQ614098	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
149	CG20	2cArq3G07	HQ614099	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_I</i>	100%
150	CG20	2cArq3G02	HQ614100	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
151	CG20	2cArq3G04	HQ614101	<i>Euryarchaeota</i>	92%	-	-
152	CG20	2cArq3H03	HQ614102	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
153	CG20	2cArq3H08	HQ614103	<i>Crenarchaeota</i>	96%	-	-
154	CG20	2cArq3G10	HQ614104	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
155	CG20	2cArq3H02	HQ614105	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
156	CG20	2cArq3G01	HQ614106	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
157	CG20	2cArq2C10	HQ614107	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
158	CG20	2cArq2C11	HQ614108	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
159	CG20	2cArq3F11	HQ614109	<i>Euryarchaeota</i>	85%	-	-
160	CG20	2cArq3F09	HQ614110	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
161	CG20	2cArq3E06	HQ614111	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanomicrobiaceae</i>	100%
162	CG20	2cArq3F02	HQ614112	<i>Crenarchaeota</i>	96%	<i>Thermoprotei</i>	95%
163	CG20	2cArq3F04	HQ614113	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
164	CG20	2cArq3F05	HQ614114	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
165	CG20	2cArq3D08	HQ614115	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
166	CG20	2cArq3D10	HQ614116	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
167	CG20	2cArq3D12	HQ614117	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
168	CG20	2cArq3E01	HQ614118	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
169	CG20	2cArq1C02	HQ614119	<i>Crenarchaeota</i>	90%	-	-
170	CG20	2cArq1C07	HQ614120	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
171	CG20	2cArq1C08	HQ614121	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
172	CG20	2cArq1C09	HQ614122	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
173	CG20	2cArq1C10	HQ614123	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
174	CG20	2cArq1D02	HQ614124	<i>Crenarchaeota</i>	100%	<i>Soil_Crenarchaeotic_Group</i>	100%
175	CG20	2cArq1D05	HQ614125	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
176	CG20	2cArq1D06	HQ614126	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
177	CG20	2cArq1D07	HQ614127	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
178	CG20	2cArq1B11	HQ614128	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
179	CG20	2cArq1B10	HQ614129	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
180	CG20	2cArq3D05	HQ614130	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
181	CG20	2cArq3D03	HQ614131	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
182	CG20	2cArq3D06	HQ614132	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
183	CG20	2cArq3D01	HQ614133	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
184	CG20	2cArq3D02	HQ614134	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
185	CG20	2cArq3C07	HQ614135	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
186	CG20	2cArq3C10	HQ614136	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
187	CG20	2cArq1A07	HQ614137	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
188	CG20	2cArq1A09	HQ614138	<i>Crenarchaeota</i>	100%	SAGMCG-1	100%
189	CG20	2cArq1A01	HQ614139	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
190	CG20	2cArq1A04	HQ614140	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
191	CG20	2cArq1B07	HQ614141	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
192	CG20	2cArq1B09	HQ614142	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
193	CG20	2cArq1B04	HQ614143	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
194	CG20	2cArq1B05	HQ614144	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
195	CG20	2cArq3C06	HQ614145	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
196	CG20	2cArq3B09	HQ614146	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
197	CG20	2cArq2B01	HQ614147	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
198	CG20	2cArq3B10	HQ614148	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
199	CG20	2cArq1H12	HQ614149	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
200	CG20	2cArq3B11	HQ614150	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
201	CG20	2cArq1H10	HQ614151	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
202	CG20	2cArq3B12	HQ614152	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
203	CG20	2cArq1H05	HQ614153	<i>Crenarchaeota</i>	100%	SAGMCG-1	100%
204	CG20	2cArq3C01	HQ614154	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
205	CG20	2cArq1H04	HQ614155	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
206	CG20	2cArq1H03	HQ614156	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
207	CG20	2cArq1H02	HQ614157	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
208	CG20	2cArq1G12	HQ614158	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanocella</i>	100%
209	CG20	2cArq1G09	HQ614159	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
210	CG20	2cArq1G05	HQ614160	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
211	CG20	2cArq2H06	HQ614161	<i>Euryarchaeota</i>	95%	<i>Methanomicrobia</i>	82%
212	CG20	2cArq1D10	HQ614162	<i>Crenarchaeota</i>	100%	SAGMCG-1	100%
213	CG20	2cArq3B06	HQ614163	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
214	CG20	2cArq3B04	HQ614164	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
215	CG20	2cArq3B01	HQ614165	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
216	CG20	2cArq3A01	HQ614166	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
217	CG20	2cArq1F10	HQ614167	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
218	CG20	2cArq2G12	HQ614168	<i>Crenarchaeota</i>	86%	-	-
219	CG20	2cArq1F05	HQ614169	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
220	CG20	2cArq2H01	HQ614170	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
221	CG20	2cArq1G02	HQ614171	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
222	CG20	2cArq2G09	HQ614172	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
223	CG20	2cArq1G01	HQ614173	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
224	CG20	2cArq2G10	HQ614174	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
225	CG20	2cArq1E12	HQ614175	<i>Crenarchaeota</i>	100%	SAGMCG-1	100%
226	CG20	2cArq1E10	HQ614176	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
227	CG20	2cArq1F04	HQ614177	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
228	CG20	2cArq2H03	HQ614178	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
229	CG20	2cArq1F02	HQ614179	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
230	CG20	2cArq2H04	HQ614180	<i>Crenarchaeota</i>	96%	<i>Thermoprotei</i>	94%
231	CG20	2cArq1E03	HQ614181	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
232	CG20	2cArq1E01	HQ614182	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
233	CG20	2cArq2G01	HQ614183	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
234	CG20	2cArq2F12	HQ614184	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
235	CG20	2cArq2G03	HQ614185	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	96%
236	CG20	2cArq2G02	HQ614186	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
237	CG20	2cArq2F09	HQ614187	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanocella</i>	100%
238	CG20	2cArq2F10	HQ614188	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
239	CG20	2cArq2F11	HQ614189	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
240	CG20	2cArq2F02	HQ614190	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
241	CG20	2cArq2F04	HQ614191	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
242	CG20	2cArq2F05	HQ614192	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
243	CG20	2cArq2F07	HQ614193	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
244	CG20	2cArq2F01	HQ614194	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
245	CG20	2cArq2E07	HQ614195	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
246	CG20	2cArq2E06	HQ614196	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
247	CG20	2cArq2C03	HQ614197	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanocella</i>	100%
248	CG20	2cArq2E03	HQ614198	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
249	CG20	2cArq2C02	HQ614199	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
250	CG20	2cArq2E04	HQ614200	<i>Crenarchaeota</i>	100%	<i>Thermoprotei</i>	98%
251	CG20	2cArq2C07	HQ614201	<i>Euryarchaeota</i>	100%	GOM_Arc_I	100%
252	CG20	2cArq2D11	HQ614202	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
253	CG20	2cArq2C06	HQ614203	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
254	CG20	2cArq2E01	HQ614204	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
255	CG20	2cArq2C09	HQ614205	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
256	CG20	2cArq2D05	HQ614206	<i>Euryarchaeota</i>	100%	GOM_Arc_I	100%
257	CG20	2cArq2C08	HQ614207	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
258	CG20	2cArq2D06	HQ614208	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
259	CG20	2cArq2D02	HQ614209	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
260	CG20	2cArq2D03	HQ614210	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
261	CG20	2cArq2B11	HQ614211	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
262	CG20	2cArq2B06	HQ614212	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
263	CG20	2cArq2C01	HQ614213	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
264	CG20	2cArq2B12	HQ614214	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	45%
265	CG50	5cArq1A07	HQ614215	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
266	CG50	5cArq1B01	HQ614216	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
267	CG50	5cArq1B02	HQ614217	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
268	CG50	5cArq1B03	HQ614218	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
269	CG50	5cArq1B05	HQ614219	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
270	CG50	5cArq1B07	HQ614220	<i>Crenarchaeota</i>	98%	<i>Thermoprotei</i>	95%
271	CG50	5cArq1B08	HQ614221	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
272	CG50	5cArq1B12	HQ614222	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
273	CG50	5cArq2E01	HQ614223	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
274	CG50	5cArq2E03	HQ614224	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
275	CG50	5cArq2C11	HQ614225	<i>Euryarchaeota</i>	82%	-	-
276	CG50	5cArq2D02	HQ614226	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
277	CG50	5cArq2D09	HQ614227	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
278	CG50	5cArq2D10	HQ614228	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
279	CG50	5cArq2E08	HQ614229	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
280	CG50	5cArq2E07	HQ614230	<i>Crenarchaeota</i>	96%	<i>Thermoprotei</i>	91%
281	CG50	5cArq2E12	HQ614231	<i>Crenarchaeota</i>	97%	<i>Thermoprotei</i>	91%
282	CG50	5cArq2E09	HQ614232	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
283	CG50	5cArq2E04	HQ614233	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
284	CG50	5cArq2B08	HQ614234	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
285	CG50	5cArq2A09	HQ614235	<i>Crenarchaeota</i>	99%	<i>Thermoprotei</i>	95%
286	CG50	5cArq2B04	HQ614236	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
287	CG50	5cArq2A07	HQ614237	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
288	CG50	5cArq2A08	HQ614238	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
289	CG50	5cArq2A02	HQ614239	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
290	CG50	5cArq2A05	HQ614240	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
291	CG50	5cArq2C10	HQ614241	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
292	CG50	5cArq2C08	HQ614242	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
293	CG50	5cArq2C01	HQ614243	<i>Crenarchaeota</i>	98%	<i>Thermoprotei</i>	93%
294	CG50	5cArq2B12	HQ614244	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
295	CG50	5cArq2H08	HQ614245	<i>Crenarchaeota</i>	97%	<i>Thermoprotei</i>	95%
296	CG50	5cArq2H09	HQ614246	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
297	CG50	5cArq3A02	HQ614247	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
298	CG50	5cArq3A03	HQ614248	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
299	CG50	5cArq3A04	HQ614249	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
300	CG50	5cArq3A10	HQ614250	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
301	CG50	5cArq3A08	HQ614251	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
302	CG50	5cArq3A12	HQ614252	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
303	CG50	5cArq3A11	HQ614253	<i>Crenarchaeota</i>	100%	<i>Thermoprotei</i>	98%
304	CG50	5cArq3B02	HQ614254	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
305	CG50	5cArq3B01	HQ614255	<i>Crenarchaeota</i>	96%	<i>Thermoprotei</i>	95%
306	CG50	5cArq2G02	HQ614256	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
307	CG50	5cArq2G03	HQ614257	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
308	CG50	5cArq2F07	HQ614258	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
309	CG50	5cArq2G01	HQ614259	<i>Crenarchaeota</i>	99%	<i>Thermoprotei</i>	96%
310	CG50	5cArq2G05	HQ614260	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
311	CG50	5cArq2G09	HQ614261	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
312	CG50	5cArq2G08	HQ614262	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	84%
313	CG50	5cArq2H07	HQ614263	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
314	CG50	5cArq2H02	HQ614264	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
315	CG50	5cArq2H01	HQ614265	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
316	CG50	5cArq2G12	HQ614266	<i>Euryarchaeota</i>	100%	GOM_Arc_I	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
317	CG50	5cArq3C05	HQ614267	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
318	CG50	5cArq3C04	HQ614268	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
319	CG50	5cArq3C06	HQ614269	<i>Crenarchaeota</i>	97%	<i>Thermoprotei</i>	95%
320	CG50	5cArq3D06	HQ614270	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
321	CG50	5cArq3E02	HQ614271	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
322	CG50	5cArq3E03	HQ614272	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
323	CG50	5cArq3E04	HQ614273	<i>Euryarchaeota</i>	97%	-	-
324	CG50	5cArq3C09	HQ614274	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
325	CG50	5cArq3C10	HQ614275	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
326	CG50	5cArq3C12	HQ614276	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
327	CG50	5cArq3D05	HQ614277	<i>Crenarchaeota</i>	95%	-	-
328	CG50	5cArq3B06	HQ614278	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
329	CG50	5cArq3B05	HQ614279	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
330	CG50	5cArq3B04	HQ614280	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
331	CG50	5cArq1E06	HQ614281	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	99%
332	CG50	5cArq3C02	HQ614282	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
333	CG50	5cArq3C03	HQ614283	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
334	CG50	5cArq3B12	HQ614284	<i>Crenarchaeota</i>	94%	-	-
335	CG50	5cArq3C01	HQ614285	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
336	CG50	5cArq3B10	HQ614286	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
337	CG50	5cArq3B11	HQ614287	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
338	CG50	5cArq3B07	HQ614288	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
339	CG50	5cArq3B08	HQ614289	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
340	CG50	5cArq3H08	HQ614290	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
341	CG50	5cArq1G03	HQ614291	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
342	CG50	5cArq1G08	HQ614292	<i>Crenarchaeota</i>	100%	-	-
343	CG50	5cArq3H06	HQ614293	<i>Crenarchaeota</i>	100%	<i>Thermoprotei</i>	100%
344	CG50	5cArq1F08	HQ614294	<i>Crenarchaeota</i>	99%	<i>Thermoprotei</i>	98%
345	CG50	5cArq3H03	HQ614295	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
346	CG50	5cArq1F07	HQ614296	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
347	CG50	5cArq1G01	HQ614297	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
348	CG50	5cArq1F12	HQ614298	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
349	CG50	5cArq1F02	HQ614299	<i>Crenarchaeota</i>	99%	<i>Thermoprotei</i>	91%
350	CG50	5cArq1F01	HQ614300	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
351	CG50	5cArq1F06	HQ614301	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
352	CG50	5cArq1F05	HQ614302	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
353	CG50	5cArq3G04	HQ614303	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
354	CG50	5cArq3G03	HQ614304	<i>Crenarchaeota</i>	99%	<i>Thermoprotei</i>	98%
355	CG50	5cArq3G06	HQ614305	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
356	CG50	5cArq3G05	HQ614306	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
357	CG50	5cArq3G08	HQ614307	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
358	CG50	5cArq3G07	HQ614308	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
359	CG50	5cArq1G02	HQ614309	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	90%
360	CG50	5cArq3H01	HQ614310	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
361	CG50	5cArq3G12	HQ614311	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	91%
362	CG50	5cArq3E05	HQ614312	<i>Crenarchaeota</i>	97%	<i>Thermoprotei</i>	89%
363	CG50	5cArq1H12	HQ614313	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
364	CG50	5cArq2A01	HQ614314	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
365	CG50	5cArq1H11	HQ614315	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
366	CG50	5cArq1H08	HQ614316	<i>Crenarchaeota</i>	99%	MCG	86%
367	CG50	5cArq1C02	HQ614317	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
368	CG50	5cArq1H06	HQ614318	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
369	CG50	5cArq1H04	HQ614319	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
370	CG50	5cArq1D05	HQ614320	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
371	CG50	5cArq1H02	HQ614321	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	85%
372	CG50	5cArq1C09	HQ614322	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
373	CG50	5cArq3E06	HQ614323	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
374	CG50	5cArq1H01	HQ614324	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
375	CG50	5cArq3E08	HQ614325	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
376	CG50	5cArq1G12	HQ614326	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
377	CG50	5cArq1G11	HQ614327	<i>Crenarchaeota</i>	96%	<i>Thermoprotei</i>	90%
378	CG50	5cArq1G10	HQ614328	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
379	CG50	5cArq3H12	HQ614329	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
380	CG50	5cArq3E12	HQ614330	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
381	CG50	5cArq1E03	HQ614331	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
382	CG50	5cArq3H11	HQ614332	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
383	CG50	5cArq3F01	HQ614333	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
384	CG50	5cArq1E01	HQ614334	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
385	CG50	5cArq3H10	HQ614335	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	90%
386	CG50	5cArq3E09	HQ614336	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
387	CG50	5cArq3H09	HQ614337	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
388	CG50	5cArq3E10	HQ614338	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
389	CG50	5cArq1E05	HQ614339	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_I</i>	100%
390	CG50	5cArq3F12	HQ614340	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
391	CG50	5cArq1D07	HQ614341	<i>Crenarchaeota</i>	96%	-	-
392	CG50	5cArq3G01	HQ614342	<i>Crenarchaeota</i>	86%	-	-
393	CG50	5cArq1D06	HQ614343	<i>Crenarchaeota</i>	99%	<i>Thermoprotei</i>	98%
394	CG50	5cArq3F06	HQ614344	<i>Crenarchaeota</i>	83%	-	-
395	CG50	5cArq1D12	HQ614345	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
396	CG50	5cArq3F10	HQ614346	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
397	CG50	5cArq1D11	HQ614347	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	96%
398	PA20	2pArq3H08	HQ614348	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	98%
399	PA20	2pArq2D05	HQ614349	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
400	PA20	2pArq3H11	HQ614350	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
401	PA20	2pArq2D07	HQ614351	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	93%
402	PA20	2pArq2D10	HQ614352	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
403	PA20	2pArq3G09	HQ614353	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
404	PA20	2pArq3G10	HQ614354	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
405	PA20	2pArq3G11	HQ614355	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
406	PA20	2pArq3G12	HQ614356	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
407	PA20	2pArq2E02	HQ614357	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
408	PA20	2pArq2D11	HQ614358	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
409	PA20	2pArq2E05	HQ614359	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
410	PA20	2pArq2E04	HQ614360	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
411	PA20	2pArq2F01	HQ614361	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
412	PA20	2pArq2E07	HQ614362	<i>Crenarchaeota</i>	99%	MCG	87%
413	PA20	2pArq3H12	HQ614363	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
414	PA20	2pArq2F06	HQ614364	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
415	PA20	2pArq2F03	HQ614365	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
416	PA20	2pArq3F12	HQ614366	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
417	PA20	2pArq2B12	HQ614367	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
418	PA20	2pArq2C04	HQ614368	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanomicrobiaceae</i>	100%
419	PA20	2pArq3F10	HQ614369	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
420	PA20	2pArq2B10	HQ614370	<i>Crenarchaeota</i>	99%	-	-
421	PA20	2pArq3F11	HQ614371	<i>Crenarchaeota</i>	99%	MCG	93%
422	PA20	2pArq2B11	HQ614372	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
423	PA20	2pArq3F07	HQ614373	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
424	PA20	2pArq3F09	HQ614374	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanomicrobiaceae</i>	100%
425	PA20	2pArq3F05	HQ614375	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
426	PA20	2pArq3F06	HQ614376	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
427	PA20	2pArq3G05	HQ614377	<i>Crenarchaeota</i>	100%	AK59	100%
428	PA20	2pArq2C10	HQ614378	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
429	PA20	2pArq3G04	HQ614379	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
430	PA20	2pArq2C09	HQ614380	<i>Euryarchaeota</i>	57%	-	-
431	PA20	2pArq3G03	HQ614381	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanomicrobiaceae</i>	100%
432	PA20	2pArq2C07	HQ614382	<i>Crenarchaeota</i>	100%	AK59	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
433	PA20	2pArq3G02	HQ614383	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
434	PA20	2pArq2D03	HQ614384	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	88%
435	PA20	2pArq2D01	HQ614385	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
436	PA20	2pArq2C12	HQ614386	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	98%
437	PA20	2pArq2C11	HQ614387	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
438	PA20	2pArq3D12	HQ614388	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
439	PA20	2pArq2A11	HQ614389	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
440	PA20	2pArq3E02	HQ614390	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
441	PA20	2pArq3E03	HQ614391	<i>Crenarchaeota</i>	95%	-	-
442	PA20	2pArq3E05	HQ614392	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
443	PA20	2pArq3E06	HQ614393	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
444	PA20	2pArq1H12	HQ614394	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
445	PA20	2pArq3E07	HQ614395	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
446	PA20	2pArq2A02	HQ614396	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	93%
447	PA20	2pArq3E09	HQ614397	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
448	PA20	2pArq2A09	HQ614398	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
449	PA20	2pArq3E10	HQ614399	<i>Euryarchaeota</i>	100%	SAGMEG	100%
450	PA20	2pArq2A10	HQ614400	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
451	PA20	2pArq2B05	HQ614401	<i>Euryarchaeota</i>	100%	GOM_Arc_I	100%
452	PA20	2pArq2B04	HQ614402	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
453	PA20	2pArq2B09	HQ614403	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
454	PA20	2pArq2B06	HQ614404	<i>Euryarchaeota</i>	100%	GOM_Arc_I	100%
455	PA20	2pArq3E12	HQ614405	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
456	PA20	2pArq3F04	HQ614406	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
457	PA20	2pArq2B01	HQ614407	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanosaeta</i>	100%
458	PA20	2pArq3F01	HQ614408	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
459	PA20	2pArq2A12	HQ614409	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	91%
460	PA20	2pArq3C10	HQ614410	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
461	PA20	2pArq3D01	HQ614411	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
462	PA20	2pArq3C08	HQ614412	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
463	PA20	2pArq1G10	HQ614413	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanoregula</i>	100%
464	PA20	2pArq3C09	HQ614414	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
465	PA20	2pArq1H01	HQ614415	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanosaeta</i>	100%
466	PA20	2pArq3D04	HQ614416	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
467	PA20	2pArq1G03	HQ614417	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
468	PA20	2pArq3D05	HQ614418	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
469	PA20	2pArq1G09	HQ614419	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	93%
470	PA20	2pArq3D02	HQ614420	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
471	PA20	2pArq1G01	HQ614421	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
472	PA20	2pArq3D03	HQ614422	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
473	PA20	2pArq1G02	HQ614423	<i>Euryarchaeota</i>	100%	GOM_Arc_I	100%
474	PA20	2pArq3D07	HQ614424	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
475	PA20	2pArq1H11	HQ614425	<i>Euryarchaeota</i>	100%	GOM_Arc_I	100%
476	PA20	2pArq1H10	HQ614426	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
477	PA20	2pArq1H09	HQ614427	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	84%
478	PA20	2pArq1H08	HQ614428	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
479	PA20	2pArq3D11	HQ614429	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
480	PA20	2pArq1H02	HQ614430	<i>Euryarchaeota</i>	100%	GOM_Arc_I	100%
481	PA20	2pArq3D10	HQ614431	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
482	PA20	2pArq1D06	HQ614432	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
483	PA20	2pArq1D07	HQ614433	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
484	PA20	2pArq1D10	HQ614434	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
485	PA20	2pArq3C02	HQ614435	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
486	PA20	2pArq3C01	HQ614436	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
487	PA20	2pArq3B10	HQ614437	<i>Crenarchaeota</i>	88%	-	-
488	PA20	2pArq3B09	HQ614438	<i>Crenarchaeota</i>	80%	-	-
489	PA20	2pArq3B12	HQ614439	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
490	PA20	2pArq3B11	HQ614440	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	87%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
491	PA20	2pArq3A12	HQ614441	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanosaeta</i>	100%
492	PA20	2pArq3A10	HQ614442	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
493	PA20	2pArq3B07	HQ614443	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
494	PA20	2pArq3B05	HQ614444	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
495	PA20	2pArq3C07	HQ614445	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
496	PA20	2pArq1D01	HQ614446	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
497	PA20	2pArq1C07	HQ614447	<i>Crenarchaeota</i>	93%	-	-
498	PA20	2pArq1D03	HQ614448	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
499	PA20	2pArq1D02	HQ614449	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
500	PA20	2pArq1B06	HQ614450	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
501	PA20	2pArq1B01	HQ614451	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
502	PA20	2pArq1B09	HQ614452	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Rice_Cluster_II</i>	100%
503	PA20	2pArq1B07	HQ614453	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
504	PA20	2pArq1F11	HQ614454	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanomicrobiaceae</i>	100%
505	PA20	2pArq1F12	HQ614455	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
506	PA20	2pArq1F09	HQ614456	<i>Crenarchaeota</i>	98%	MCG	94%
507	PA20	2pArq1F10	HQ614457	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanosaeta</i>	100%
508	PA20	2pArq3A09	HQ614458	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
509	PA20	2pArq3A08	HQ614459	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
510	PA20	2pArq3A07	HQ614460	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
511	PA20	2pArq3A06	HQ614461	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	97%
512	PA20	2pArq3A03	HQ614462	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	98%
513	PA20	2pArq3A02	HQ614463	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	92%
514	PA20	2pArq2H11	HQ614464	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	97%
515	PA20	2pArq2H09	HQ614465	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
516	PA20	2pArq2H04	HQ614466	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanomicrobiales</i>	100%
517	PA20	2pArq2G12	HQ614467	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
518	PA20	2pArq1F06	HQ614468	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%

Nº	Amostra	Clone	GenBank ID	Filo	Limite de Confiança	Classificação mais profunda	Limite de Confiança
519	PA20	2pArq1F05	HQ614469	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
520	PA20	2pArq1F01	HQ614470	<i>Crenarchaeota</i>	99%	MCG	88%
521	PA20	2pArq1E12	HQ614471	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
522	PA20	2pArq1E11	HQ614472	<i>Euryarchaeota</i>	100%	GOM_Arc_I	100%
523	PA20	2pArq1D12	HQ614473	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
524	PA20	2pArq1D11	HQ614474	<i>Crenarchaeota</i>	99%	MCG	81%
525	PA20	2pArq2G09	HQ614475	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
526	PA20	2pArq1A11	HQ614476	<i>Euryarchaeota</i>	100%	<i>Methanomicrobiaceae</i>	100%
527	PA20	2pArq1A12	HQ614477	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
528	PA20	2pArq2F08	HQ614478	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
529	PA20	2pArq2F07	HQ614479	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	98%
530	PA20	2pArq2G07	HQ614480	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
531	PA20	2pArq2G08	HQ614481	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	98%
532	PA20	2pArq2G03	HQ614482	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
533	PA20	2pArq1A10	HQ614483	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
534	PA20	2pArq2G06	HQ614484	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	96%
535	PA20	2pArq2G01	HQ614485	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
536	PA20	2pArq2F10	HQ614486	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
537	PA20	2pArq2F12	HQ614487	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
538	PA20	2pArq2F09	HQ614488	<i>Crenarchaeota</i>	100%	TG	100%
539	PA20	2pArq1A08	HQ614489	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
540	PA20	2pArq1A04	HQ614490	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
541	PA20	2pArq1A03	HQ614491	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%
542	PA20	2pArq1A01	HQ614492	<i>Crenarchaeota</i>	100%	MCG	100%

As seqüências do gene *SSU rRNA* de *Archaea* foram classificadas através do programa *Mothur*, utilizando o banco de dados Silva como referência (disponível no sítio: <http://www.arb-silva.de/>). Na coluna “GenBank ID” é mostrado o código identificador das seqüências no banco de genes *GenBank* (disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Na coluna “Classificação mais profunda” é mostrada somente a classificação taxonômica das seqüências que apresentaram limites de confiança $\geq 80\%$. O limite de confiança representa a probabilidade de uma determinada seqüência pertencer àquela taxonomia. MCG: *Miscellaneous_Crenarchaeotic_Group*; TG: *terrestrial_group*; SAGMCG-1: *South_African_Gold_Mine_Gp_1*; SAGMEG: *South_African_Goldmine_Gp*; GOM_Arc_I: *Gulf of Mexico_Archaea_I*

APÊNDICE 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NO CICLO DO CARBONO

Organismo	Gene	Oligo nucleotídeo Iniciador	Seqüência	Referência
Metanogênico	<i>mcrA</i>	ML-F ML-R	5'- GGTGGTGT <u>M</u> GGATTACACARTAYGCW ACAGC 5'- TTCATTGC <u>R</u> TAGTTWGG <u>R</u> TAGTT	LUTON <i>et al.</i> , 2002
Metanotrófico	<i>pmoA</i>	A189-F A682-R	5'- GG <u>N</u> GACTGGGACTTCTGG 5'- GAAS <u>G</u> C <u>N</u> GAGAAGAAS <u>G</u> C	HOLMES <i>et al.</i> , 1995

Legenda: As letras sublinhadas correspondem a posições degeneradas, onde: M = A + C; Y = C + T; R = A + G; N = A + G + C + T; W = A + T; S = C + G.